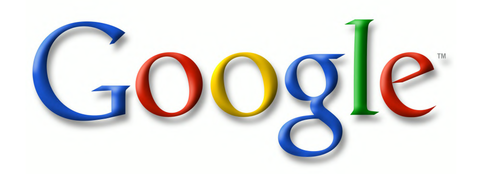
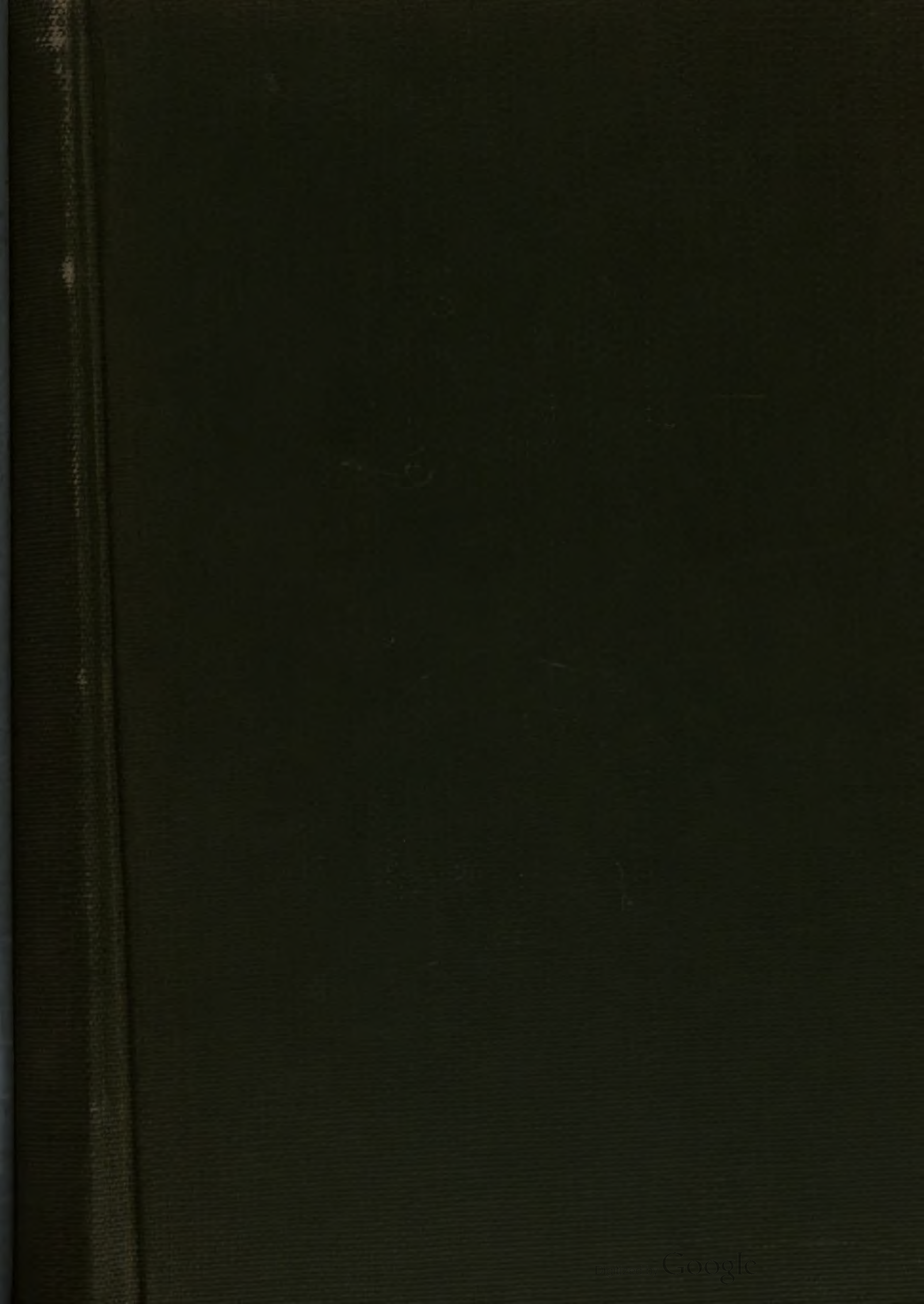
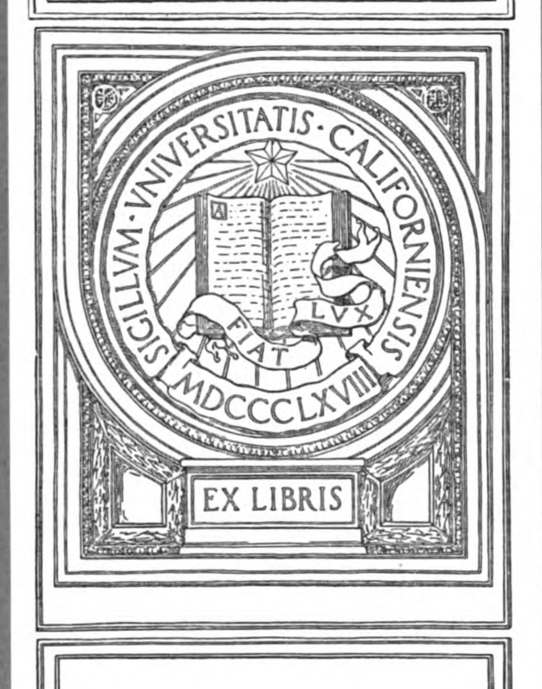
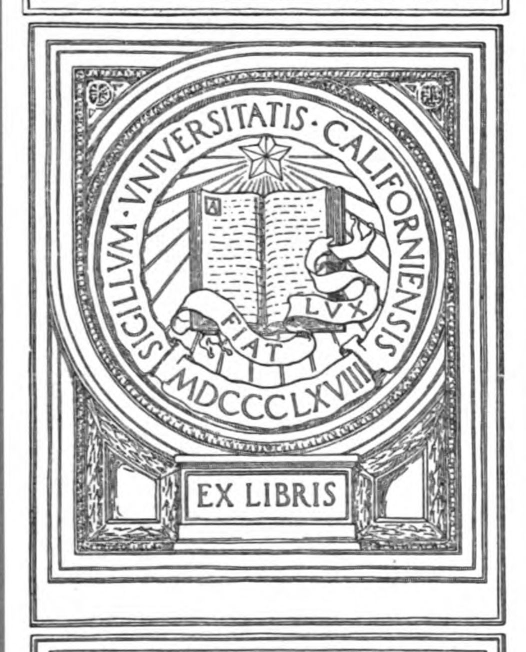





MEDICAL SCHOOL
LIBRARY
SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
LVX
FIAT
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS


SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
LVX
FIAT
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

190. Band



Berlin
Verlag von Julius Springer
1927

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig

Inhalt.

Über die Verteilung der reduzierenden Substanz zwischen Blutplasma und quergestreiftem Muskel.

(Ein Beitrag zur Frage nach dem Mechanismus der Insulinwirkung.)

Von

Baldomero Sanchez Cuenca (Madrid).

(Aus dem Laboratorium der städtischen Krankenanstalten in Mannheim.)

(Eingegangen am 1. September 1927.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Die in folgendem mitgeteilten Untersuchungen beabsichtigen, die Verteilung des Traubenzuckers zwischen Blutplasma und quergestreifter Muskulatur zu ermitteln. Besonders sollte festgestellt werden, ob die Verteilung des Zuckers zwischen Blutplasma und quergestreifter Muskulatur vom Insulingehalt des Plasmas und der Gewebe abhängig ist.

Zu diesem Zwecke wurde bei weißen männlichen Mäusen, welche nach der öfters beschriebenen, im hiesigen Laboratorium üblichen Weise vorbehandelt waren, die reduzierende Substanz im Fluorid-Plasma und in der Muskulatur der vorderen Bauchwand nach *Hagedorn-Jensen* bestimmt und als Traubenzucker berechnet.

Dabei wurde folgendermaßen verfahren: Möglichst viel Blut wurde durch Punktion des am Boden der Orbita gelegenen venösen Sinus gewonnen, sofort in ein mit NaF in Substanz beschicktes kleines Zentrifugenglas gegeben und augenblicklich scharf zentrifugiert. Das Plasma wurde abgehoben. Je zwei Proben (je nach der erhaltenen Plasmamenge zwischen 0,03 und 0,1 ccm schwankend) wurden nach *Hagedorn* und *Jensen* auf reduzierende Substanz verarbeitet. Die Abmessung geschah mit 0,1-ccm-Pipetten, die auf 0,001 graduiert waren und durch Auswiegen mit Hg geeicht wurden. Im Mittel betrug der Fehler (aus 28 beliebigen Doppelbestimmungen berechnet) 3,5 %. Sofort nach der Blutentnahme wurde das Tier getötet, die Haut über dem Abdomen abpräpariert und zwei symmetrische Muskelstücke aus der rechten und linken vorderen Bauchwand herausgeschnitten, die auf einer Torsionswage rasch auf 0,2 mg gewogen wurden. Die Muskelstücke wogen zwischen 80 und 200 mg. Sie kamen sofort in eisgekühlte, kleine Porzellanreibschalen, welche etwas Quarzsand und 2 ccm 94 %igen Alkohol von 0° enthielten. Sie wurden dann unter Alkohol rasch fein zerrieben. Dann wurde der gesamte Inhalt

der kleinen Reibschale mit 94%igem Alkohol von 0° in ein Zentrifugenglas quantitativ übergespült, wobei ein Gesamtvolumen von etwa 10 ccm erhalten wurde. Der Alkohol wurde abzentrifugiert, der Rückstand aufgerührt und dreimal mit 2 ccm 94%igem Alkohol gewaschen. Der Extrakt- und Waschalkohol wurde in kleinen, halbkugeligen Glasschalen entweder mit Föhn zur Trockne gebracht, oder im Wasserbad bis auf 1 bis 2 ccm eingeengt, der Rest mit Föhn zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in 5 ccm 0,45%iger $ZnSO_4$-Lösung aufgenommen und dann weiter wie bei der Blutzuckerbestimmung nach *Hagedorn* und *Jensen* verfahren. Es zeigte sich bald, daß dieses zeitraubende Verfahren durch ein viel einfacheres ersetzt werden konnte; dieses bestand in folgendem: Die Muskeln kamen sofort nach Entnahme aus dem Tiere in Reagenzgläser, welche in Eis standen und 5 ccm 0,45%ige $ZnSO_4$-Lösung enthielten, die auf 0° abgekühlt war. Hierin wurden die Muskeln 2 Stunden bei 0° belassen, dann wurde 1 ccm n/10 NaOH zugesetzt und weiter wie bei der Blutzuckerbestimmung nach *Hagedorn-Jensen* verfahren. Bei sechs symmetrischen Muskelpaaren ergaben die beiden Methoden folgende Werte:

Tier Nr.	mg Zucker pro 100 g Muskel		Differenz in % des Alkoholwertes
	Alkoholmethode	Zinksulfatmethode	
17	99	98	— 1
18	60	79	+ 32
19	125	129	+ 3
20	50	55	+ 10
21	131	138	+ 5
22	122	127	+ 4
Mittelwert:	97,9	104,4	+ 6,6 %

Wurden je sechs symmetrische Muskeln beide Male nach der Alkoholmethode verarbeitet, so ergab sich:

Tier Nr.	mg Zucker pro 100 g Muskel		Differenz in % des kleinsten Wertes
	Muskel rechts	Muskel links	
11	53	65	22,6
12	52	53	1,9
13	57	57	0
14	53	55	3,8
15	42	45	6,6
16	56	54	3,7
Mittelwert:	52	56	7,7 %

Wie man sieht, ist die Übereinstimmung zwischen dem rechten und dem linken Muskel bei beiden Methoden die gleiche. Im Mittel aus sechs Tieren stimmen der rechte und der linke Muskel auf etwa 7% miteinander überein. Da stets Mittelwerte aus den beiden Bestimmungen gezogen wurden, ist der Fehler bei der Bestimmung des Muskelzuckers auf 3,5% anzusetzen, er ist also etwa ebenso groß, wie der Fehler bei der Bestimmung des Plasmazuckers.

Wesentlich ist noch die Angabe der Zeiten, zu denen das Blut gewonnen, das Tier getötet, die Muskelstücke entnommen wurden. Der Tod des Tieres erfolgte etwa 1 Minute nach der Blutentnahme. 2 bis 3 Minuten später war das erste Muskelstück entnommen und gewogen, zwei weitere Minuten später ebenso das zweite.

Der Kürze halber wird in folgendem stets von „Plasmazucker" und „Muskelzucker" gesprochen werden. Damit soll natürlich nicht gesagt sein, daß die als Traubenzucker berechnete reduzierende Substanz im Plasma und im Muskel zu 100% aus Traubenzucker besteht. Einmal ist neben dem Traubenzucker in beiden Fällen noch die sogenannte „Restreduktion" vorhanden. Zweitens sind im Muskel Hexosephosphatester vorhanden, deren Reduktionskraft um etwa 20 bis 30% geringer ist, als dem in ihnen enthaltenen Hexoserest entspricht. Die hier gegebenen Daten können daher nur als Orientierungsversuche betrachtet werden, die aber eine erste Annäherung an die wirklichen Verhältnisse gestatten.

Sämtliche Werte sind in Milligrammen pro 100 g Muskel und in Milligrammen pro 100 ccm Plasma wiedergegeben.

Zuerst wurde festgestellt, wie sich Muskel- und Plasmazucker bei Tieren, die seit 18 Stunden hungern und bei Tieren, die reichlich mit Brot und Milch gefüttert wurden, verhielten. Die Ergebnisse sind in Tabelle I und II zusammengestellt.

Tabelle I.

Hungertiere.

Datum	Plasmazucker	Muskelzucker	Quotient
7. VI.	88,5	53	0,59
8. VI.	65,5	54,5	0,83
8. VI.	70,5	59	0,79
9. VI.	84	52,5	0,62
10. VI.	68,5	57	0,83
11. VI.	84	54	0,64
Mittelwert:	76	55	0,72

Tabelle II.

Gefütterte Tiere.

Datum	Plasmazucker	Muskelzucker	Quotient
24. V.	120	110	0,9
24. V.	158,5	95	0,59
27. V.	144,5	94	0,65
31. V.	124,5	120	0,96
1. VI.	141	122	0,86
3. VI.	151,5	110	0,72
Mittelwert:	140	108,5	0,77

Die Mittelwerte aus je 6 Versuchen ergeben für das Hungertier 76 mg Plasmazucker, 55 mg Muskelzucker, Verteilungsquotient 0,72, für das gefütterte Tier 140 mg Plasmazucker, 108,5 mg Muskelzucker, Verteilungsquotient 0,77. Der mittlere Fehler berechnet sich für den Verteilungsquotienten des Hungertieres zu 0,046, für den des gefütterten Tieres zu 0,061. Die zwischen Hungertier und gefüttertem Tier gefundenen Differenzen im Verteilungsquotienten liegen also in den Fehlergrenzen. Wir erhalten mithin das wichtige Ergebnis, daß das Hungertier, dessen Insulinsekretion nach *Staub*[1] u. a. als sehr gering anzusehen ist, und das reichlich mit Kohlehydraten gefütterte Tier, dessen Insulinsekretion wohl als maximal anzusehen ist, den gleichen Verteilungsquotienten für Plasmazucker und Muskelzucker besitzen. Dabei beträgt der absolute Wert für den Plasmazucker beim gefütterten Tiere etwa das Doppelte des Wertes der Hungertiere. Stets ist der Quotient kleiner als 1. Es sind nun früher im hiesigen Laboratorium durch *Bernhard*[2] und *Bissinger*[3] an mit Ringerlösung durchspülten herausgeschnittenen Lebern vom Frosch und von der Ratte die Verteilungsquotienten des Traubenzuckers zwischen Ringerlösung und Lebergewebe bestimmt worden, dabei fand *Bernhard* den Quotienten im Mittel zu 0,736, *Bissinger* zu 0,663. Der Mittelwert für den Quotienten $\frac{\text{Plasmazucker}}{\text{Muskelzucker}}$ beträgt, wenn wir ihn aus den Werten für das Hungertier und das gefütterte Tier zusammen ziehen, 0,745 und liegt den Leberwerten sehr nahe. Diese Übereinstimmung kann kein Zufall sein, sie muß daher in allen drei Fällen denselben Grund haben, und zwar folgenden. Als Lösungsmittel für Traubenzucker fungiert nicht das gesamte Gewebe, sondern nur das in ihm enthaltene Wasser. Der Wassergehalt des Muskels und der Leber ist aber nicht sehr verschieden. *P. Rona*[4] hat in einer grundlegenden Untersuchung schon im Jahre 1910 durch Kompensationsdialyse gezeigt, daß im Pferdeserum etwa 6% des Gesamtvolumens als ,,nicht lösender Raum" für Kristalloide anzusehen ist. In unserem Falle ist es nicht möglich, den ,,nicht lösenden Raum" im Muskel und im Plasma anzugeben. Es wurde statt dessen der Wassergehalt des Muskels und des Plasmas bei hungernden und gefütterten Tieren ermittelt. Im Mittel aus je drei Bestimmungen ergab sich dabei:

[1] *Staub*, Insulin, 2. Aufl., S. 88ff., Berlin, Springer, 1925; ferner Zeitschr. f. klin. Med. **104**, 587, 1926.

[2] *Bernhard*, diese Zeitschr. **157**, 396, 1925.

[3] *Bissinger*, ebendaselbst **185**, 239, 1927.

[4] *Rona*, diese Zeitschr. **29**, 506, 1910; vgl. ferner hierzu *Augsberger*, Ergebn. d. Phys. **24**, 618, 1925.

	Plasma	Muskel
Hungertier	93,0 % H_2O	76,7 % H_2O
Gefüttertes Tier	93,9 % H_2O	77,0 % H_2O

Berechnen wir die im Muskel und im Plasma erhaltenen Werte nicht auf 100 g Muskel und 100 ccm Plasma, sondern auf 100 g Muskel*wasser* und 100 g Plasma*wasser*, so ergibt sich für das Hungertier $\frac{76 \cdot 100}{93} = 81{,}7$ Plasmazucker und $\frac{55 \cdot 100}{76{,}7} = 71{,}7$ Muskelzucker und als Verteilungsquotient 0,88, während sich ebenso für das gefütterte Tier die Zahlen ergeben: $\frac{140 \cdot 100}{93{,}9} = 149$ Plasmazucker und $\frac{108{,}5 \cdot 100}{77}$ $= 141$ Muskelzucker und als Verteilungsquotient 0,95. Bilden wir das Mittel aus allen Werten, so finden wir, daß im Muskelwasser 92% des Zuckers gelöst sind, welche das Plasmawasser löst. Wenn berücksichtigt wird, daß einmal der Bruchteil der reduzierenden Substanz, welcher Traubenzucker ist, im Plasma und im Muskel nicht genau der gleiche zu sein braucht, und daß zweitens die Fehlerbreite der Versuche eine ziemlich beträchtliche ist, so wird man schließen dürfen, daß bei stationären Zuständen, d. h. wenn Diffusionsgleichgewicht zwischen Muskel und Blut eingetreten ist, der Zucker sich gleichmäßig auf das Muskelwasser und das Plasmawasser verteilt. Es sind keinerlei Anhaltspunkte für die Annahme da, daß beim gefütterten, also insulinreichen Tier, so etwas wie eine Adsorption von Zucker im Muskel vorkommt, welche den Muskelzucker auf höhere Werte als den Plasmazucker steigert. Die Tatsache, daß das Maximum des Quotienten

$$\frac{\text{Zucker in 100 Muskelwasser}}{\text{Zucker in 100 Plasmawasser}}$$

nur 0,95 beträgt, gibt einen gewissen Hinweis darauf, daß vielleicht ein kleiner Teil des Muskelwassers (höchstens 12%) nicht als Lösungsmittel für Traubenzucker fungiert. Es ist aber die Genauigkeit der erhaltenen Werte nicht groß genug, um mit Sicherheit einen solchen Schluß zu ziehen[1].

Wenn nun die Verteilung des Zuckers zwischen Blutplasma und Muskel vom Insulingehalt der Gewebe unabhängig ist, so könnte die

[1] Die Tatsache, daß 100 g Muskel stets weniger reduzierende Substanz enthalten als 100 g Blutplasma, ist zuerst von *Palmer* beim Hunde gefunden worden. (Journ. of biol. Chem. 30, 79, 1917.) *Palmer* findet beim Hunde, der zuletzt an dem, dem Versuch vorhergehenden Tage gefüttert wurde, im Mittel den Plasmazucker zu 112, den Muskelzucker zu 68,3, den Quotienten zu 0,61. Eine Erklärung dafür, daß der Quotient stets kleiner als 1 ist, gibt *Palmer* nicht.



Geschwindigkeit, mit der die Verteilung vor sich geht, doch bei insulinarmen und insulinreichen Tieren verschieden sein. Mit anderen Worten: Das Eindringen des Zuckers in den Muskel könnte beim insulinreichen Tier schneller vor sich gehen, als beim insulinarmen. Um diese Frage zu prüfen, wurde folgendermaßen vorgegangen. Die Maus erhielt in die Schwanzvene so viel 10%ige Traubenzuckerlösung injiziert, daß auf 100 g Maus ungefähr 0,2 g Traubenzucker injiziert wurden. 5, 10, 15, 23, 30 Minuten später wurde die Bestimmung des Plasma- und des Muskelzuckers vorgenommen. Es wurden dabei möglichst Mittelwerte aus je 4 Tieren gezogen. Im ganzen wurden drei solche Versuchsreihen angestellt. An Hungertieren und gefütterten Tieren je eine. Eine dritte an Hungertieren, die gleichzeitig mit der Zuckergabe noch 0,09 Einheiten Insulin *Brand* pro 100 g Tier intravenös bekamen. Endlich eine vierte Reihe an gefütterten Tieren, bei denen die Verteilung zwischen Plasma und Muskel bei endogener Hyperglykämie durch subkutane Injektion von 0,02 mg Adrenalin untersucht wurde. Im ganzen wurden 84 Tiere analysiert.

Die erhaltenen Werte sind in den Tabellen III bis VI zusammengestellt. Die Mittelwerte, die aus diesen Zahlen gewonnen wurden, sind in Tabelle VII bis X aufgeführt. Auf Grund der Tabelle VII bis X wurden die drei Kurven gezeichnet.

Tabelle III.

Hungertiere mit intravenöser Zuckerinjektion.

Zeit in Minuten seit der Injektion	Plasmazucker	Muskelzucker	Quotient
5	542	153	0,28
5	565	172	0,30
5	494	136	0,28
5	602	168	0,28
10	555	136	0,25
10	643	122	0,19
10	480	103	0,21
10	486	121	0,25
15	349	67	0,19
15	376	114	0,30
15	416	106	0,25
15	400	109	0,27
15	260	142	0,55
23	200	85	0,43
23	232	130	0,56
23	237	90	0,38
23	163	118	0,72
28	251	99	0,39
30	210	70	0,33
30	223	87	0,39
30	203	65	0,32

Tabelle IV.

Gefütterte Tiere nach Zuckerinjektion.

Zeit in Minuten seit der Injektion	Plasmazucker	Muskelzucker	Quotient
5	411	247	0,60
5	487	149	0,31
5	512	194	0,38
7	403	283	0,70
10	423	219	0,52
10	202	106	0,52
10	413	148	0,36
10	442	181	0,41
15	532	248	0,47
15	450	124	0,29
15	251	148	0,59
15	186	162	0,87
23	178	159	0,89
23	182	140	0,77
23	242	160	0,66
23	176	134	0,76
31	221	135	0,61
33	202	128	0,63

Tabelle V.

Hungertiere nach Injektion von Zucker und Insulin.

Zeit in Minuten seit der Injektion	Plasmazucker	Muskelzucker	Quotient
5	596	199	0,33
5	385	115	0,30
5	420	80	0,19
5	496	97	0,20
9	322	187	0,55
10	133	104	0,78
10	133	89	0,67
10	205	115	0,56
12	127	147	1,16
15	51	115	2,26
15	91	91	1,00
15	42	93	2,21
18	87	81	0,93
23	23	71	3,10
23	34	94	2,80
25	44	78	1,80
25	33	91	2,80

Tabelle VI. Gefütterte Tiere nach Adrenalininjektion subkutan.

Zeit in Minuten seit der Adrenalininjektion	Plasmazucker	Muskelzucker	Quotient
7	324	160	0,49
7	138	154	1,12
7	192	155	0,81
7	165	144	0,87
10	157	151	0,96
10	217	130	0,60
11	212	142	0,69
15	341	146	0,43
15	237	164	0,69
15	236	152	0,64
15	190	155	0,81
20	280	182	0,65
20	227	234	1,03

Tabelle VII. Mittelwerte der Hungertiere nach Zuckerinjektion.

Zeit in Minuten seit der Injektion	Plasmazucker	Muskelzucker	Quotient
vorher	76	55	0,72
5	551	157	0,28
10	541	121	0,24
15	360	108	0,30
23	208	106	0,51
30	224	80	0,36

Tabelle VIII. Mittelwerte der gefütterten Tiere nach Zuckerinjektion.

Zeit in Minuten seit der Injektion	Plasmazucker	Muskelzucker	Quotient
vorher	140	108,5	0,77
5	453	218	0,48
10	370	164	0,44
15	355	171	0,48
23	195	148	0,76
32	212	132	0,62

Tabelle IX.
Mittelwerte der Hungertiere nach Injektion von Zucker und Insulin.

Zeit in Minuten seit der Injektion	Plasmazucker	Muskelzucker	Quotient	
5	477	123	0,26	
10	198	124	0,63	
12	127	147	1,16	nur ein Wert
15	61	66	1,08	
18	87	81	0,93	nur ein Wert
23	29	83	2,86	je zwei Werte
25	39	85	2,18	(je zwei Werte)

Tabelle X. Mittelwerte der gefütterten Tiere nach Adrenalininjektion.

Zeit in Minuten seit der Adrenalininjektion	Plasmazucker	Muskelzucker	Quotient
7	205	153	0,75
10	195	141	0,72
15	251	154	0,61
22	254	208	0,82

Abb. 1. Abb. 2. Abb. 3.

Abb. 1 stellt den Plasmazucker dar. Abb. 2 stellt den Muskelzucker dar.

Abb. 3 stellt den Quotienten $\frac{\text{Muskelzucker}}{\text{Plasmazucker}}$ dar.

Die beiden Geraden stellen jedesmal die Mittelwerte für das unbeeinflußte Tier dar.

- - - Gefüttertes Tier. ——— Hungertier.

–·–·– Hungertier + Insulin. –·· – Gefüttertes Tier + Adrenalin.

Abszisse: Zeit in Minuten.

Ordinate: bei Abb. 1 mg Traubenzucker pro 100 ccm Plasma.
bei Abb. 2 mg Traubenzucker pro 100 g Muskel.
bei Abb. 3 Quotient $\frac{\text{Muskelzucker}}{\text{Plasmazucker}}$.

Die Betrachtung der Werte für den Plasmazucker ergibt, daß beim Hungertier der Plasmazucker in den ersten 10 Minuten sehr erheblich langsamer, dann aber ebenso schnell absinkt wie der Plasmazucker des gefütterten Tieres. Die Kurven für den Muskelzucker ergeben, daß in allen Fällen der Plasmazucker augenblicklich in den Muskel eindringt. Die Kurven für den Muskelzucker verlaufen beim gefütterten und beim Hungertier ungefähr parallel. Ihr mittlerer Abstand voneinander (= 50 mg) entspricht fast genau der mittleren Differenz zwischen dem Muskelzucker der Hungertiere und der gefütterten Tiere (53,5 mg). Man darf aber hieraus nicht schließen, daß der Plasmazucker in beiden Fällen mit gleicher Geschwindigkeit in den Muskel diffundiert, denn die Triebkraft — das Diffusionsgefälle — ist in beiden Fällen verschieden. Rechnen wir die erhaltenen Werte auf 100 g Muskelwasser und 100 g Plasmawasser um, und berechnen wir aus diesen Werten das Diffusionsgefälle für den Zucker vom Plasma in den Muskel, so ergeben sich folgende Zahlen:

Tabelle XI.

Diffusionsgefälle in mg pro 100 g Muskel- und Plasmawasser		
Zeit in Minuten	Hungertier	Gefüttertes Tier
5	388	206
10	424	179
15	246	154
23	86	14
30	137	53

Obwohl also das Diffusionsgefälle beim Hungertier etwa doppelt so groß ist wie beim gefütterten Tier, dringt anfangs nur ebensoviel Zucker in den Muskel ein wie beim gefütterten Tier, d. h. also die Geschwindigkeit, mit der der Zucker in den Muskel eindringt, ist beim Hungertier kleiner als beim gefütterten Tier. Dies geht besonders deutlich aus der Betrachtung der Abb. 3 hervor, welche die Quotienten darstellt. Auch hier verlaufen die Kurven für das gefütterte und das Hungertier fast genau parallel. Während aber beim gefütterten Tier nach 23 Minuten die normale Verteilung erreicht ist, wird sie beim Hungertier in der von mir gewählten Versuchszeit überhaupt nicht erreicht. Es kann also aus diesem Verlaufe der Kurven mit Sicherheit der Schluß gezogen werden, daß der Zucker beim Hungertier langsamer in den Muskel eindringt als beim gefütterten Tier. Das gleiche ergibt sich für die übrigen Gewebe des Körpers. Obwohl das Diffusionsgefälle beim gefütterten Tier kleiner sein muß wie beim Hungertier, ergibt die Rechnung, daß die Traubenzuckermenge, welche in die übrigen Gewebe des Körpers nach 5 Minuten eingedrungen ist, in beiden Fällen

etwa die gleiche ist. Wenn man die Plasmamenge einer 20 g schweren Maus zu 1 ccm ansetzt und das Gewicht der Muskeln zu 10 g, ergibt sich bei der Injektion von 40 mg Zucker beim Hungertier 5 Minuten nach der Injektion:

Anfänglich vorhanden	in 1 ccm Plasma . .	0,8 mg Zucker	
	in 10 g Muskel . . .	5,5 „ „	
	injiziert	40,0 „ „	
	im ganzen	46,3 mg Zucker	
nach 5 Minuten	in 1 ccm Plasma	5,5 „ „	
	in 10 g Muskel	15,7 „ „	
	im ganzen	21,2 mg Zucker	
demnach im übrigen Körper = 9 g	. . . .	25,1 „ „	= 0,28%

während der Muskel um diese Zeit 0,16% enthält. Beim gefütterten Tier ergibt die gleiche Rechnung 25,9 mg Zucker in 9 g Restkörper oder 0,29%, während der Muskel um diese Zeit 0,22% enthält.

Ein Blick auf die Muskelzuckerkurve zeigt nun, daß diese beim gefütterten und beim Hungertier einen recht ähnlichen Verlauf aufweist. Beide Kurven sinken anfangs steiler, dann etwas langsamer ab. Eine Erklärung hierfür beim Hungertier zu geben, ist schwierig. Trotzdem soll es wenigstens versucht werden. Auf Grund der Erfahrungen von *Lesser*[1], sowie von *Bissinger* und *Lesser*[2] können drei Vorgänge ausgeschlossen werden. Der Muskelzucker sinkt beim Hungertier weder weil er verbrannt wird, noch weil er zu Milchsäure wird, noch weil er zu Glykogen synthetisiert wird. *Lesser* fand nämlich beim Hungertier nach intraperitonealer Zufuhr von 0,22 g Zucker pro 100 g Tier in der ersten Stunde keine Änderung des respiratorischen Quotienten. *Bissinger* und *Lesser* fanden ebenso nach 30 Minuten keine Glykogenbildung. Dagegen fanden sie nach 30 Minuten 31% des injizierten Zuckers beim Hungertier nicht mehr wieder. In meinem Fall beträgt der Muskelzucker 5 Minuten nach Injektion von 40 mg Traubenzucker 157 mg, und nach 30 Minuten 80 mg. Es verschwinden also im Muskel in 25 Minuten pro 10 g Muskel 7,7 mg Zucker oder 19% der injizierten Menge. Hierzu kommt noch die unbekannte Zuckermenge, welche in den Muskel aus dem Plasma in 25 Minuten diffundiert ist. Der Plasmazucker sinkt in dieser Zeit von 551 auf 224. Es verschwinden also aus 1 ccm Plasma 3,3 mg Traubenzucker. In den ersten 5 Minuten gehen von dem aus dem Plasma verschwindenden Zucker 29% in den Muskel. Nehmen wir selbst an, daß später mehr in den Muskel geht, etwa 50%, so würde dies 1,7 mg Traubenzucker ausmachen, in 10 g Muskel verschwänden dann nicht 7,7, sondern 9,4 mg Zucker oder 24% der in-

[1] *Lesser*, diese Zeitschr. **158**, 39, 1924.
[2] *Bissinger* und *Lesser*, ebendaselbst **168**, 398, 1926.

jizierten Zuckermenge. Vermutlich handelt es sich dabei um denselben Vorgang, den *Bissinger* und *Lesser* bei intraperitonealer Injektion beobachtet haben, nämlich um eine Verminderung der Reduktionskraft des Muskelzuckers. Als Ursache hierfür könnte man an eine Phosphatveresterung denken. Wenn dies zutrifft, so wird der Quotient $\frac{\text{Muskelzucker}}{\text{Plasmazucker}}$ um einen unbekannten Wert zu hoch gefunden. Die Verteilung des Zuckers, für die natürlich nur die nicht veresterte Glucose in Frage kommen kann, wäre dann beim Hungertier noch stärker zu Ungunsten des Muskels verschoben.

Das Absinken der Kurve des Muskelzuckers beim gefütterten Tier ist dagegen wohl in erster Linie auf Oxydation des Zuckers zu beziehen, in zweiter auf Glykogensynthese. Die Menge des in 25 Minuten verschwindenden Muskelzuckers beträgt 8,6 mg. Hierzu käme noch die unbekannte Zuckermenge, welche in 25 Minuten in den Muskel aus dem Plasma diffundiert und die sich, auf die gleiche Weise wie beim Hungertier geschätzt, zu 1,2 mg ergibt. Der gesamte Zuckerschwund im Muskel würde also 9,8 mg in 25 Minuten betragen. Unter ähnlichen, aber nicht genau gleichen Versuchsbedingungen fand Herr Dr. *Ammon* im hiesigen Laboratorium in der gleichen Zeit eine Oxydation von 5,3 mg Traubenzucker und eine Glykogensynthese von 1,3 mg Traubenzucker pro 10 g Maus, zusammen also einen Zuckerschwund von 6,6 mg. 10 g Maus, in denen etwa 5 g Muskel enthalten sind, haben demnach 70% des Zuckerumsatzes, den wir für 10 g Muskel berechnet haben. Ein Ergebnis, das mit Rücksicht darauf, daß sich der Zuckerumsatz zum überwiegenden Teile in den Muskeln abspielt, zu erwarten ist. Das Ergebnis des Vergleiches des Hungertieres und des gefütterten Tieres nach Zuckerinjektion ist mithin, daß der Zucker beim Hungertier in den Muskel langsamer eindringt als beim gefütterten Tier, oder anders ausgedrückt, daß beim Hungertier eine erheblich längere Zeit vergehen muß, bis wieder die normale Verteilung des Zuckers zwischen Muskel und Blutplasma eingetreten ist.

In der Zeit zwischen der 23. und der 30. Minute nach der Zuckerinjektion steigt der Plasmazucker wieder leicht an und gleichzeitig sinkt der Quotient. Beide Erscheinungen treten gleichmäßig beim gefütterten und beim Hungertier auf. Sie sind vielleicht darauf zurückzuführen, daß der Plasmazucker unter den Wert des Restkörperzuckers gesunken ist, und daß nun aus dem Restkörper Zucker in das Plasma zurückströmt.

Von besonderem Interesse ist das Verhalten des Plasma- und Muskelzuckers und des Quotienten nach intravenöser Injektion von Zucker und Insulin. Die Plasmazuckerkurve sinkt in der bekannten Weise geradlinig ab und erreicht bereits nach 15 Minuten einen leicht

hypoglykämischen Wert, während nach 22 bis 25 Minuten stark hypoglykämische Werte im Plasma auftreten. Bereits der 5 Minuten nach der Injektion erhaltene Wert des Plasmazuckers ist niedriger als der Wert beim Hungertier ohne Insulin, aber er ist noch etwas höher als beim gefütterten Tier. Die Werte des Muskelzuckers erreichen nur einmal die Kurve des Hungertieres, gewöhnlich liegen sie erheblich tiefer. Da wir aus den Versuchen von *Bissinger* und *Lesser* wissen, daß unter diesen Versuchsbedingungen bei der Maus eine außerordentlich schnelle Verbrennung des Traubenzuckers verbunden mit Glykogensynthese einsetzt, die nach den Versuchen von *Dale*, *Burn*, *Best*, *Hoet* und *Marks*[1] vor allem im Muskel vor sich geht, ergibt sich der wichtige Schluß: *Die Geschwindigkeit der Zuckerverbrennung im Muskel ist unabhängig von der Höhe des Muskelzuckers, abhängig aber von dem Insulingehalt von Blutplasma und Muskel.* Der niedrigste Wert für den Muskelzucker tritt nach 15 Minuten auf, dann folgt wieder ein leichtes Ansteigen des Muskelzuckers, obwohl der Plasmazucker weiter sinkt. Dieser Anstieg könnte durch Hydrolyse von vorher synthetisiertem Muskelglykogen veranlaßt sein. Sehr überraschend ist der zeitliche Verlauf des Quotienten. 5 Minuten nach der Injektion finden wir den gleichen Wert für den Quotienten wie beim Hungertier. Dies liegt nicht etwa daran, daß das Insulin noch nicht gewirkt hat. Der Plasmazucker, der 5 Minuten nach Injektion von Zucker und Insulin um 74 mg tiefer liegt als beim Hungertier nach Injektion von Zucker allein, zeigt, daß bereits eine kräftige Insulinwirkung da ist. Dieses Verhalten macht es wenig wahrscheinlich, daß die erste Wirkung des Insulins eine Änderung der Verteilung des Zuckers zwischen Blutplasma und Muskel ist. Von nun an steigt der Quotient beinahe geradlinig steil an, so daß schon nach 10 Minuten eine nahezu normale Verteilung des Zuckers zwischen Muskel und Plasma eingetreten ist, die innerhalb von 30 Minuten vom Hungertier überhaupt nicht, vom gefütterten Tier erst nach 23 Minuten erreicht wird. Dann aber steigt der Quotient weiter, er beträgt nach 15 Minuten schon 1 und steigt nach Eintritt stärkerer Hypoglykämie sogar auf Werte bis zu 2,8! Diese hohen Werte zu erklären, ist recht schwierig. Es könnte sich einmal darum handeln, daß bei Hypoglykämie mehr Muskelglykogen hydrolysiert, als verbrannt wird. Es könnte aber auch sein, daß in den späteren Stadien der Insulinwirkung Zucker im Muskel adsorbiert wird. Auf Grund des bisher vorliegenden Versuchsmaterials können wir keine Entscheidung zwischen beiden Möglichkeiten treffen. Es wird in erster Linie nötig sein, den zeitlichen Verlauf der Glykogenbildung und Hydrolyse im Muskel

[1] *Dale*, *Burn*, *Best*, *Hoet* und *Marks*, Journ. of physiol. **59**, 164, 1924; Proc. Roy. Soc. **100**, 32, 55, 1926.

unter genau gleichen Versuchsbedingungen aufzuzeichnen. Der Vorgang ist aber von allen Untersuchern beobachtet worden, welche gleichzeitig Muskel- und Blutzucker bei der Insulinhypoglykämie bestimmt haben. Eine Anzahl derartiger Werte habe ich in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle XII.

Nach Insulingabe Zucker in mg		Quotient	Tierart	Beobachter
in 100 g Blut	in 100 g Muskel			
44	79	1,79	Maus	*Cori* und *Cori*[1]
42	94	2,24	Kaninchen	*Dieselben*[1]
48	48	1	"	*Hetenyi*[2]
50,5	81	1,6	Ratte	*Müller*[3]
88	182	2,1	Dekapitierte,	*Best, Hoet* u. *Marks*[4]
130	190	1,5	eviszerierte	*Best, Dale, Hoet* u.
34	240	7,0	Katze	*Marks*[5]
34	42	1,2	Kaninchen	*Staub* und *Fröhlich*[6]

Die ersten, die auf diese außerordentlich interessante Erscheinung aufmerksam gemacht haben, sind *Best*, *Dale*, *Hoet* und *Marks* gewesen (a. a. O. S. 66). Diese Autoren haben an ihren Präparaten (dekapitierte, eviszerierte Katzen) die gleiche Erscheinung aber auch ohne Insulingabe gefunden, wenn sie die Tiere lediglich durch Ausschaltung der Leber hypoglykämisch machten. Sie fanden dann ebenfalls bei einem Blutzucker von 68 einen Muskelzucker von 229, also einen Quotienten von 3,4 (l. c. S. 60). Es ist also möglich, daß das Auftreten von Quotienten, die 1 und mehr betragen, eine Folge der Hypoglykämie ist, nicht aber eine Folge der Insulinwirkung an sich.

Die Versuche mit Adrenalininjektion (Tabelle VI und X) weichen von den Versuchen mit Zuckerinjektion am gefütterten Tiere vor allem dadurch ab, daß die erzielte Hyperglykämie sehr viel geringer ist. Eine stärkere Störung des Verteilungsgleichgewichtes zwischen Plasmazucker und Muskelzucker tritt daher nicht ein, die Diffusionsgeschwindigkeit des Traubenzuckers in den Muskel ist also groß genug, um das Diffusionsgefälle sehr schnell zum Verschwinden zu bringen, auch wenn der Plasmazucker bis 254 steigt. Die Kurve der Quotienten ergibt, daß sich das gefütterte Tier bei gleicher Plasmazuckerhöhe (etwa 20 Minuten nach der Injektion) nahezu ebenso verhält wie das

[1] Journ. pharm. a. ther. **24**, 474, 1925.
[2] Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **45**, 439, 1925.
[3] Diese Zeitschr. **175**, 491, 1926.
[4] Proc. Roy. Soc. **100**, 32, 1926.
[5] Ebendaselbst **100**, 55, 1926.
[6] *J. Staub*, Insulin, 2. Aufl., S. 55.

Adrenalintier. Der gleiche Befund ist für die Adrenalinhyperglykämie bereits 1917 von *Palmer* beim Hund erhoben worden (l. c. S. 92). Er fand im Mittel beim normalen Hund und 2 Stunden nach Adrenalininjektion:

	Plasmazucker	Muskelzucker	Quotient
Normaler Hund	112	68,3	0,61
Normaler Hund, 2 Std. nach Adrenalininjektion	323	200	0,62

Der Vergleich der Verteilung des Zuckers zwischen Blutplasma und Muskel unter den verschiedenen von mir gewählten Versuchsbedingungen (Hungertiere mit geringer Insulinsekretion, gefütterte Tiere mit maximaler Insulinsekretion, Hungertiere nach Insulininjektion) ergibt also, daß die normale Verteilung nach Überflutung des Plasmas mit Traubenzucker am schnellsten beim Insulintier wieder eintritt (10 Minuten), erheblich länger beim gefütterten Tier braucht (23 Minuten) und beim Hungertier bei der von mir gewählten Versuchsdauer überhaupt nicht eintritt[1]. Die einfachste Erklärung für diese Erscheinung wäre die Annahme, daß die für die Diffusion im Muskel zur Verfügung stehende Fläche in den drei Fällen verschieden ist, d. h. daß die Zahl der offenen Kapillaren im Muskel am größten beim Insulintier, am kleinsten beim Hungertier wäre. Dann dürfte der Vorgang am herausgeschnittenen Muskel nicht mehr erhalten werden. In der Tat haben Bestimmungen der Diffusionskonstante des Traubenzuckers im herausgeschnittenen Muskel der weißen Maus, welche zurzeit im hiesigen Laboratorium durchgeführt werden, aber noch nicht abgeschlossen sind, für das Hungertier, das gefütterte Tier, und das Hungertier bei Gegenwart von Insulin bisher etwa identische Werte ergeben.

[1] Die Änderungen im Wassergehalt von Muskel und Plasma sind so geringfügig, daß sie keinen wesentlichen Einfluß auf die in vorstehendem beschriebenen Resultate haben. Ich habe eine Reihe solcher Bestimmungen ausgeführt, deren Resultate hier kurz angeführt seien:

g H_2O in 100 g		Versuchsbedingungen	
Blutplasma	Muskel		
93,0	76,7	Hungertier	Mittelwert aus je drei Tieren
93,9	77,0	Gefüttertes Tier	
93,0	76,3	Hungertier, 12 Min. nach intravenöser Zuckerinjektion	
93,4	78,0	Gefüttertes Tier, 12 Min. nach intravenöser Zuckerinjektion	
92,2	75,7	Hungertier, 12 Min. nach Injektion von Zucker + 0,09 E. Insulin *Brand* pro 100 g Maus	

Zusammenfassung.

1. Der Quotient $\frac{\text{reduzierende Substanz in 100 ccm Blutplasma}}{\text{reduzierende Substanz in 100 gr Muskel}}$ beträgt bei der seit 18 Stunden hungernden Maus 0,72 $\pm$ 0,05, bei der gefütterten Maus 0,77 $\pm$ 0,06.

2. Der Quotient $\frac{\text{reduzierende Substanz in 100 ccm Blutplasmawasser}}{\text{reduzierende Substanz in 100 g Muskelwasser}}$ beträgt für das hungernde Tier 0,88, für das gefütterte Tier 0,95. Muskelwasser und Plasmawasser haben nahezu das gleiche Lösungsvermögen für Traubenzucker.

3. Wird der Maus pro 100 g Tier 0,2 g Traubenzucker in 10%iger Lösung in die Schwanzvène injiziert, so ist 5 Minuten nach der Injektion der Plasmazucker am höchsten bei der Hungermaus (551 mg pro 100 ccm Plasma), am niedrigsten bei der gefütterten Maus (453), der Wert der Hungerinsulinmaus liegt zwischen beiden Werten und dem des gefütterten Tieres ziemlich nahe (477).

4. Trotzdem wird bei der Hungermaus und der Hungerinsulinmaus zu dieser Zeit der gleiche, erheblich zu niedrige Verteilungsquotient (0,28 und 0,26) gefunden.

5. Bis der normale Verteilungskoeffizient wieder erreicht wird, vergehen bei der Hungerinsulinmaus 10 Minuten, bei der gefütterten Maus 23 Minuten. Bei der Hungermaus tritt innerhalb von 30 Minuten überhaupt keine normale Verteilung ein.

6. Es wird gefolgert, daß der Zucker am schnellsten bei der Insulinmaus, am langsamsten bei der Hungermaus in den Muskel eindringt, die einfachste Erklärung hierfür wäre die Annahme, daß die Zahl der offenen Kapillaren im Muskel am größten bei der Insulinmaus, am kleinsten bei der Hungermaus ist.

7. Es wird die Erfahrung früherer Autoren (*Cori* und *Cori*, *Hetenyi*, *Müller*, *Best*, *Dale*, *Hoet* und *Marks*, *Staub* und *Fröhlich*) bestätigt, daß nach Eintritt der Insulinhypoglykämie der Quotient $\frac{\text{Muskelzucker}}{\text{Plasmazucker}}$ die Einheit überschreitet.

Über das Verhältnis von chemischer Reaktivität zu biologischer Aktivität bei Eisenverbindungen.

Von

L. Rosenfeld (Charkow).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 19. Juli 1927.)

Nachdem von *Baudisch* und *Welo* (1) gezeigt worden war, daß eine bestimmte Modifikation des Eisenoxyds das Wachstum gewisser Bakterienstämme, die zu ihrem Gedeihen einen Blutzusatz zum Nährboden benötigen, befördert, wenn man es an Stelle des Blutes dem Nährboden zufügt, während eine andere Modifikation des Eisenoxyds diese Wirkung nicht hat, war der Nachweis erbracht worden, daß in chemischer Hinsicht mit Rücksicht auf ihre Zusammensetzung völlig identische Eisenverbindungen sich biologisch verschieden wirksam erweisen, wenn sie sich in physikalischer Hinsicht und auch in ihren chemischen reaktionellen Eigenschaften verschieden verhalten. Denn dieses biologisch aktive Eisenoxyd gab eine positive Benzidinreaktion, war magnetisch aktiv und hatte eine bestimmte kubische Kristallstruktur, alles Eigenschaften, die dem biologisch inaktiven Eisenoxyd fehlten.

Auf Veranlassung von Professor *Bickel* hat dann *Wada* (2) den Einfluß dieses aktiven und inaktiven Eisenoxyds bei der peroralen Gabe auf den Stoffwechsel an Kaninchen studiert und gefunden, daß das aktive Eisenoxyd eine starke Verminderung in der N-Ausfuhr durch den Harn bei annähernd unveränderter C-Ausscheidung herbeiführt und den Harnquotienten C/N stark in die Höhe treibt. Das inaktive Eisenoxyd hatte eine derartige Wirkung während seiner Gabe überhaupt nicht, sondern ließ sie nur angedeutet als schwache Nachwirkung nach dem Aussetzen der Eisenmedikation erkennen.

Nachdem durch diese Untersuchungen der Beweis erbracht worden war, daß das aktive Eisenoxyd in der Tat ganz bestimmte allgemeine Stoffwechselwirkungen beim höheren Tiere hervorruft, die dem in-



aktiven Oxyd nicht zustehen, setzte eine eifrige Tätigkeit der Chemiker in den verschiedensten Laboratorien der Welt ein, die darauf abzielte, sogenannte aktive Eisenverbindungen herzustellen, um sie therapeutisch verwenden zu können. Es wurden rasch Wege gefunden, Eisenoxyde und Eisencarbonate und andere Eisenverbindungen, deren chemischer Charakter oft überhaupt nicht genauer ermittelt war, herzustellen, die alle eine positive Benzidinreaktion gaben, und die deshalb als „aktive" Eisenverbindungen bezeichnet wurden. Es war der Begriff der biologischen Aktivität mit dem Begriff eines besonderen chemischen Reaktionsvermögens, nämlich der Fähigkeit, Wasserstoffsuperoxyd zu zersetzen und eine positive Benzidinreaktion zu geben, identifiziert worden. Man glaubte, daß dann, wenn eine Eisenverbindung eine positive Benzidinreaktion gebe, also in besonderem Sinne chemisch aktiv sei, sie auch biologisch aktiv sein müsse. Bei genauerer Betrachtung der Sachlage gab es aber für die Berechtigung zu einem solchen Schlusse keinen stichhaltigen Beweis. Da es sich jedoch immerhin um eine Frage von großem theoretischen und praktischen Interesse handelte, habe ich auf Veranlasung von Herrn Professor *Bickel* sie einer experimentellen Prüfung unterzogen.

Unter genauer Einhaltung der *Wada*schen Versuchsanordnung habe ich an Kaninchen zwei verschiedene Eisenverbindungen verfüttert. Es handelte sich um das von *Eweyk* und *Tennenbaum* hergestellte Ferro-Ferricarbonat, wie um ein aus ihm durch längeres Erhitzen an der Luft bei 50⁰ C gewonnenes Eisenoxyd. Das Ferro-Ferricarbonat gab eine sehr starke Benzidinreaktion, war aber magnetisch völlig inaktiv, das daraus gewonnene Eisenoxyd gab eine schwache Benzidinreaktion, war aber magnetisch stark wirksam.

Mit dem stark benzidinaktiven, aber magnetisch unwirksamen Ferro-Ferricarbonat hatten, wie mit einem stark benzidinaktiven, aber ebenfalls magnetisch unwirksamen Eisenoxyd, wie endlich mit dem benzidin- und magnetisch aktiven *Baudisch*schen Eisenoxyd *Bickel* und *van Eweyk* (5) Versuche über die Haltbarkeit aktiver Eisenverbindungen bei der Aufbewahrung in Wasser unter Luftzutritt angestellt, aus denen sich ergab, daß unter solchen Verhältnissen die Benzidinaktivität dieses magnetischen Präparats ganz oder fast ganz verloren geht, während das nach der *Baudisch*schen Methode hergestellte aktive Eisenoxyd unter den gleichen Bedingungen seine Benzidinaktivität wie seinen Magnetismus praktisch unverändert behält.

Als ich nun das von *Eweyk* und *Tennenbaum* hergestellte, stark benzidinaktive, unmagnetische Ferro-Ferricarbonat und ein daraus gewonnenes, schwach benzidinaktives, aber stark magnetisches Eisen-

oxyd an Kaninchen verfütterte, nahm ich in den entscheidenden Versuchen die Dosierung so vor, daß die Tiere pro Kilogramm Körpergewicht täglich mit den Präparaten per os entweder weniger oder so viel Fe oder sogar mehr Fe erhielten, als die Tiere von *Wada* bei dessen Versuche mit dem benzidinaktiven, magnetischen Eisenoxyd, das nach der *Baudisch*schen Methode dargestellt worden war, erhalten hatten.

Bei den *Wada*schen Versuchen hatten die Kaninchen an Fe-Element von dem aktiven bzw. inaktiven *Baudisch*schen Eisenoxyd 1,7 bis 1,8 mg pro Kilogramm Körpergewicht täglich bekommen. Bei meinen Versuchen mit dem schwach benzidinaktiven und stark magnetischen Eisenoxyd, von dem 1,0 g = 0,7 g Fe-Element enthielt, bekamen die Kaninchen durchschnittlich täglich 1,6, 3,2, 5,02 mg Fe, und bei den Versuchen mit dem stark benzidinaktiven, unmagnetischen Ferro-Ferricarbonat erhielten sie, da 1 g dieses Carbonats 0,42 g Fe-Element entsprach, pro Kilogramm Körpergewicht etwa 0,16 oder 1,6 oder 4,2 oder 4,33 mg Fe-Element.

Bei den Dosierungen von 0,16 bis 3,2 mg Fe trat weder während der Oxyd- noch der Carbonatgabe irgend eine Änderung im Quotienten C/N und auch keine Änderung in den absoluten täglichen Durchschnittswerten für C und N auf (Versuch I).

Bei der Oxydgabe mit Dosierungen von 5,0 oder 5,9 mg Fe pro Kilogramm war der Quotient während der Eisenperiode in dem einen Falle (Versuch III) praktisch unverändert geblieben, in dem anderen Falle (Versuch II) hatte er sich etwas erhöht.

Bei der Carbonatgabe mit Dosierungen von 4,2 bis 4,5 mg Fe pro Kilogramm war während der Gabe der Quotient im Versuch IV und VI eine Spur gesunken, im Versuch V aber praktisch unverändert geblieben, aber in den besten Versuchen, V und VI, in denen an die Eisenperiode eine eisenfreie Nachperiode angeschlossen wurde, zeigte sich in dieser Nachperiode eine deutliche, wenn auch nicht starke Quotienterhöhung, ähnlich wie sie *Wada* nach der Gabe des inaktiven *Baudisch*schen Oxyds als Nachwirkung gesehen hatte.

Aus allen diesen Beobachtungen ergibt sich, daß bei der Gabe der von *van Eweyk* und *Tennenbaum* hergestellten Eisenverbindungen, nämlich des schwach benzidinaktiven, stark magnetischen Oxyds, wie auch des stark benzidinaktiven, unmagnetischen Ferro-Ferricarbonats, während der Eisengabe überhaupt keine nennenswerten Änderungen an den Quotienten sich einstellen, aber als Nachwirkung geringe Steigerungen derselben besonders bei vorausgegangener höherer Dosierung des Eisens beobachtet wurden. Steigerung der C-Ausscheidung bei geringfügiger Senkung der N-Ausscheidung ist der Grund dafür.

Da sich die von mir untersuchten beiden Eisenverbindungen, von denen die eine (Oxyd) schwach benzidinaktiv, aber sehr stark magnetisch, die andere (Ferro-Ferricarbonat) sehr stark benzidinaktiv, aber unmagnetisch war, im wesentlichen im Tierversuch so verhielten, wie sich bei prinzipiell gleicher Versuchsanordnung das *Baudisch*sche inaktive Eisenoxyd verhalten hatte, so folgt daraus, *daß weder die Benzidinaktivität, noch auch der Magnetismus einer Eisenverbindung irgend etwas über die biologische Aktivität dieser Eisenverbindung aussagen.*

Biologisch können sich Eisenverbindungen in sehr verschiedenen Richtungen auswirken (1) (2) (6) (7). Sie können, wie wir wissen, das Blut im Nährboden gewisser Bakterien ersetzen, sie können bei Tieren wachstumsfördernd wirken, sie können zur N-Retention führen, die Größe des dysoxydablen Harn-C beeinflussen und auf die Lage des Harnquotienten C/N einwirken. Was sie im einzelnen vermögen, darüber kann vorläufig *nur* der ad hoc angestellte biologische Versuch entscheiden. *Aus der Lebhaftigkeit chemischer Reaktivität (Benzidinreaktion usw.) einer Eisenverbindung oder aus der Stärke ihres Magnetismus kann man vorläufig gar nichts auf ihre biologische Wirksamkeit und ihre therapeutische Wertigkeit schließen.*

Wenn wir heute erfahren wollen, ob eine Eisenverbindung besondere biologische Wirkungen ausübt, durch die sie vor anderen Eisenverbindungen ausgezeichnet wird, bleibt uns folglich gar nichts anderes übrig, als die Wirkungen dieser Verbindungen im biologischen Experiment nach allen Richtungen hin zu prüfen, wie es in den letzten beiden Jahren von Professor Bickel und seinen Mitarbeitern (2) (3) (4) (6) (7) *für das Baudischsche Eisenoxyd und die in den frischen Mineralquellen enthaltenen Eisenverbindungen durchgeführt worden ist.*

Meine Beobachtungen aber machen es weiterhin überaus wahrscheinlich, daß auch die Benzidinaktivität der frischen eisenhaltigen Mineralquellen nicht das entscheidende Moment für die biologische Aktivität dieser Quellen ist. Das sollten alle diejenigen Chemiker, wie z. B. *Fresenius*, wohl bedenken, die da meinen, sie hätten unter Wahrung der Ionenmischung und der Reaktion dann schon ein natürliches, eisenhaltiges Mineralwasser künstlich vollständig nachgeahmt, wenn sie ihm auch die den natürlichen Quellen eigene Benzidinreaktion verliehen hätten. Das Geheimnis der biologischen Aktivität der frischen natürlichen Eisenquellen gegenüber der biologischen Inaktivität der gealterten Quellen ist auch heute noch nicht entschleiert, nur die Änderung der biologischen Aktivität beim Altern des Wassers unter Ausschluß aller Wirkungen und Wirkungsänderungen radioaktiver Substanzen ist von *Bickel* (4) und seinen Mitarbeitern (*Gleichmann* und *Taslakowa*) (3) (4) nachgewiesen worden.

Versuch I.

Weibliches Kaninchen.

Versuchs-tag Nr.	Körper-gewicht	Harn-menge	Harn-C	Harn-N	C : N	Harn-C (pro Tag im Periodendurchschnitt)	Harn-N (pro Tag im Periodendurchschnitt)	C : N (pro Tag im Periodendurchschnitt)	Verzehrte Futtermenge pro Tag im Periodendurchschnitt	Bemerkungen
	g	ccm	g	g		g	g		g	
1	2830	380	1,185	0,958	1,236				710	Während des ganzen Versuchs frische Mohrrüben als Futter
2	2760	558	1,838	1,094	1,680				710	
3	2800	450	1,427	0,882	1,618	1,552	0,901	1,723	710	
4	2720	510	1,569	0,928	1,690				710	
5	2730	510	1,744	0,643	2,712				710	
6	2700	450	1,011	0,744	1,359				774	Vom 6 bis 10. Tage tägl. 1 mg stark benzidinakt. unmagnetisches Ferro-Ferricarbonat in 50 ccm Leitungswasser als Zulage zum Futter (= 0,16 mg Fe pro Kilogramm)
7	2700	410	1,140	0,747	1,526				774	
8	2750	566	2,004	1,070	1,872	1,496	0,932	1,605	774	
9	2700	590	2,125	1,322	1,607				774	
10	2710	650	1,202	0,778	1,545				774	
11	2710	670	2,072	0,919	2,254				900	Keine Eisenzulage zum Futter
12	2720	625	1,367	1,085	1,260				862	Vom 12. bis 16. Tage täglich 10 mg stark benzidinaktives unmagnetisches Ferro-Ferricarbonat in 50 ccm Leitungswasser als Zulage zum Futter (= 1,6 mg Fe pro Kilogramm)
13	2700	620	1,735	1,007	1,723				862	
14	2740	590	1,455	1,008	1,443	1,770	1,050	1,685	862	
15	2710	670	2,857	1,126	1,537				862	
16	2730	610	1,437	1,025	1,403				862	
17	2700	665	1,694	0,913	1,856				859	Vom 17. bis 18. Tage täglich 6 mg schwach benzidinaktives, stark magnetisches Eisenoxyd (nach *Eweyk-Tennenbaum*) in 50 ccm Leitungswasser als Zulage zum Futter, vom 19. bis 22. Tage täglich 12 mg (= 1,6 bzw. 3,2 mg Fe pro Kilogramm)
18	2750	685	1,840	0,959	1,919				859	
19	2740	590	1,788	1,115	1,603	1,611	0,943	1,708	859	
20	2750	545	1,439	0,923	1,559				859	
21	2775	645	1,632	0,939	1,738				859	
22	2750	525	1,271	0,809	1,572				859	

Versuch 11.

Männliches Kaninchen.

Versuchstag Nr.	Körpergewicht	Harnmenge	Harn-C	Harn-N	C : N	Harn-C	Harn-N	C : N	Verzehrte Futtermenge pro Tag im Periodendurchschnitt	Bemerkungen
						pro Tag im Periodendurchschnitt				
	g	ccm	g	g		g	g		g	
1	2530	640	1,740	0,717	2,426	1,209	0,552	2,187	639	Während des Versuchs frische Mohrrüben als Futter
2	2530	225	0,739	0,268	2,757				639	
3	2630	535	1,481	0,674	2,197				639	
4	2570	250	0,688	0,434	1,585				639	
5	2750	485	1,693	0,761	2,224				639	
6	2600	275	0,914	0,462	1,978				639	
7	2650	470	1,641	0,750	2,188	1,459	0,596	2,448	669	Vom 7. bis 12. Versuchstag tägl. 24 mg und am 13. Versuchstag 12 mg schwach benzidinakt., stark magnetisches Eisenoxyd (nach *Eweyk-Tennenbaum*) in 50 ccm Leitungswasser als Zulage zum Futter per os gegeben
8	2450	335	1,043	0,272	3,834				669	
9	2640	400	1,198	0,493	2,430				669	
10	2750	525	1,589	0,603	2,637				669	
11	2640	485	1,697	0,632	2,687				669	
12	2550	470	1,338	0,625	1,141				669	
13	2550	470	1,709	0,658	2,597				669	

Durchschnittliches Körpergewicht in der Vorperiode: 2601 g.

„ „ „ „ Hauptperiode: 2604 g.

Quotient in der Hauptperiode im Vergleich zur Vorperiode: + 0,261.

Pro Kilogramm Körpergewicht durchschnittlich täglich: 5,90 mg Fe (24 mg des benutzten Eisenoxyds enthalten 16,8 mg Fe).

Versuch III.
Männliches Kaninchen.

Versuchstag Nr.	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	Harn-C g	Harn-N g	C:N	Harn-C pro Tag im Periodendurchschnitt g	Harn-N pro Tag im Periodendurchschnitt g	C:N pro Tag im Periodendurchschnitt	Verzehrte Futtermenge pro Tag im Periodendurchschnitt g	Bemerkungen
1	3200	470	1,295	0,789	1,641				637	Während des ganzen Versuchs frische Mohrrüben als Futter
2	3250	420	1,124	0,705	1,594				637	
3	3180	548	1,562	0,997	1,565				637	
4	3150	520	1,743	1,238	1,408	1,446	0,953	1,517	637	
5	3100	588	1,447	1,070	1,352				637	
6	3050	510	1,338	0,857	1,561				637	
7	3130	605	1,612	1,016	1,588				637	
8	3100	385	1,022	0,701	1,457				587	Vom 8. bis 13. Versuchstag tägl. 24 mg, nur am 11. Versuchstag 12 mg schwach benzidinakt., stark magnetisches Eisenoxyd nach *Eweyk-Tennenbaum* in 50 ccm Leitungswasser als Zulage zum Futter per os gegeben
9	3100	425	1,311	0,893	1,486				587	
10	3150	550	1,697	1,078	1,574				587	
11	3040	194	1,129	0,686	1,645	1,323	0,905	1,461	587	
12	3050	410	1,714	1,217	1,410				587	
13	2960	340	1,064	0,857	1,235				587	

Durchschnittliches Körpergewicht in der Vorperiode: 3151 g.
" " " " Hauptperiode: 3067 g.
Quotient in der Hauptperiode im Vergleich zur Vorperiode: — 0,056.
Pro Kilogramm Körpergew. durchschnittl. tägl. 5,02 mg Fe oder 7,17 mg Oxyd (24 mg des benutzten Eisenoxyds enthalten 16,8 mg Fe).

Versuch IV.
Männliches Kaninchen.

Versuchs-tag Nr.	Körper-gewicht	Harn-menge	Harn-C	Harn-N	C : N	Harn-C	Harn-N	C : N	Verzehrte Futtermenge pro Tag im Periodendurchschnitt	Bemerkungen
						pro Tag im Periodendurchschnitt				
	g	ccm	g	g		g	g		g	
1	2340	570	1,481	1,037	1,428					Während des ganzen Versuchs frische Mohrrüben als Futter. Durchschnittl. Körpergewicht: 2496 g.
2	2340	435	1,520	1,157	1,310					
3	2600	280	1,047	0,627	1,670					
4	2550	310	1,091	0,825	1,322	1,239	0,866	1,431	615	
5	2550	355	1,238	0,894	1,385					
6	2550	305	1,202	0,769	1,563					
7	2540	300	1,098	0,756	1,452					
8	2540	250	1,082	0,735	1,472					25 mg stark benzidinaktives, unmagnetisches Ferro-Ferricarbonat in 10 ccm Leitungswasser als Zulage zum Futter per os tägl. vom 8. bis 15. Versuchstag. Durchschnittl. Körpergewicht: 2531 g.
9	2580	300	1,185	0,882	1,344					
10	2490	280	1,060	0,745	1,423					
11	2530	340	1,319	0,666	1,980	1,289	1,003	1,285	618	
12	2570	390	1,431	0,764	1,873					
13	2560	510	1,716	0,857	2,002					
14	2480	330	1,203	0,647	1,859					
15	2500	320	1,315	0,627	2,119					

Anmerkung: Gegen Ende der Hauptperiode wird eine leichte Quotientsteigerung bemerkbar. Dosierung: etwa 10 mg Eisencarbonat pro Kilogramm Körpergewicht (= 4,2 mg Fe-Element pro Kilogramm).

Versuch V.

Männliches Kaninchen.

Versuchstag Nr.	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	Harn-C g	Harn-N g	C : N	Harn-C g (pro Tag im Periodendurchschnitt)	Harn-N g (pro Tag im Periodendurchschnitt)	C : N (pro Tag im Periodendurchschnitt)	Verzehrte Futtermenge pro Tag im Periodendurchschnitt g	Bemerkungen
1	3010	405	1,222	0,907	1,347				646	Während des ganzen Versuchs frische Mohrrüben als Futter. In der Woche, die diesem Versuch voraufging, hatte das Tier pro Tag durchschnittlich 596 g Rüben gefressen. Durchschnittliches Körpergewicht: 3005 g.
2	3020	435	1,439	1,096	1,313				646	
3	3000	220	1,019	0,739	1,379				646	
4	3100	380	2,021	1,649	1,226	1,321	1,029	1,284	646	
5	2950	260	1,273	1,019	1,249				646	
6	2950	210	0,956	0,764	1,259				646	
7	3000	225	1,118	1,008	1,109				463	Vom 7. bis 12. Versuchstag tägl. 30 mg stark benzidinaktives, unmagnetisches Ferro-Ferricarbonat in 30 ccm Leitungswasser als Zulage zum Futter. Durchschnittl. Körpergewicht: 2925 g
8	2900	—	—	—	—				463	
9	2900	260	1,005	0,873	1,151				463	
10	2900	130	0,650	0,546	1,190	1,063	0,833	1,275	463	
11	2950	365	1,328	0,817	1,625				463	
12	2900	285	1,213	0,923	1,314				463	
13	2800	260	1,249	0,728	1,715				741	Vom 13. bis 19. Versuchstag keine Eisenzulage. Durchschnittl. Körpergewicht: 2821 g.
14	2800	360	1,251	1,058	1,188				741	
15	2830	390	1,177	0,656	1,794				741	
16	2840	395	1,003	0,603	1,564	1,223	0,714	1,712	741	
17	2830	390	1,074	0,546	1,965				741	
18	2800	540	1,538	0,751	2,034				741	
19	2850	470	1,261	0,658	1,915				741	

Anmerkung: In der Nachperiode ist eine Quotientsteigerung bemerkbar. Dosierung: etwa 10,3 mg Eisencarbonat pro Kilogramm Körpergewicht (= 4,33 mg Fe-Element pro Kilogramm).

Versuch VI.
Weibliches Kaninchen.

Versuchs-tag Nr.	Körper-gewicht	Harn-menge	Harn-C	Harn-N	C : N	Harn-C (pro Tag im Periodendurchschnitt)	Harn-N (pro Tag im Periodendurchschnitt)	C : N (pro Tag im Periodendurchschnitt)	Verzehrte Futtermenge pro Tag im Perioden-durch-schnitt	Bemerkungen
	g	ccm	g	g		g	g		g	
1	2550	510	3,970	1,999	1,986					Während des ganzen Versuchs frische Mohrrüben als Futter. Durchschnittliches Körpergew. 2540 g.
2	2580	520	2,099	0,809	2,595					
3	2550	460	1,489	0,580	2,567					
4	2570	490	1,788	0,754	2,371	1,916	0,872	2,196	721	
5	2550	530	1,526	0,594	2,569					
6	2520	370	1,258	0,622	2,023					
7	2460	265	1,281	0,749	1,726					
8	2400	170	0,848	0,547	1,550					Vom 8. bis 13. Versuchstag tägl. 25 mg stark benzidinaktives, unmagnet. Ferro-Ferricarbonat in 10 ccm Leitungswasser als Zulage zum Futter. Durchschnittliches Körpergewicht: 2440 g
9	2490	345	1,344	0,794	1,856					
10	2490	245	1,084	0,446	2,430					
11	2450	210	1,257	0,588	2,138	1,143	0,559	2,046	490	
12	2390	220	0,963	0,524	1,838					
13	2510	360	1,365	0,454	3,006					
14	2430	210	1,232	0,411	2,998					Vom 14. Versuchstag an keine Eisenzulage mehr. Durchschnittliches Körpergewicht: 2402 g
15	2590	285	1,495	0,399	3,747					
16	2440	295	1,549	0,620	2,498					
17	2390	160	1,046	0,493	2,128					
18	2450	290	1,764	0,447	3,951	1,415	0,523	2,704	559	
19	2450	380	1,559	0,691	2,256					
20	2390	250	1,538	0,560	2,746					
21	2340	335	1,372	0,563	2,417					
22	2350	340	1,179	0,524	2,250					

Anmerkung: In der Nachperiode ist eine Quotientsteigerung bemerkbar. Dosierung: etwa 10 mg Eisencarbonat pro Kilogramm Körpergewicht (= 4,2 mg Fe-Element pro Kilogramm).

Schlußsatz.

Aus der Intensität der chemischen Reaktivität einer Eisenverbindung (Vermögen, H_2O_2 zu zersetzen, die Benzidinreaktion zu geben) wie aus ihrem Verhalten gegenüber dem Magneten, kann man keinen Schluß auf die Größe der biologischen Aktivität und den therapeutischen Wert einer solchen Verbindung ziehen.

Literatur.

1) *Baudisch* und *Welo*, Die Naturwissenschaften, 13. Jahrg., H. 36. Berlin, J. Springer, 1925. — 2) *Wada*, diese Zeitschr. **175**, 62, 1926. — 3) *Bickel*, *Gleichmann* und *Taslakowa*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **54**, 1927. — 4) *Bickel*, ebendaselbst **55**, 1927. — 5) *Bickel* und *van Eweyk*, diese Zeitschr. **168**, H. 1 bis 4, 178, 1927. — 6) *I. Remesow*, ebendaselbst **168**, H. 1 bis 4, 64, 1927. — 7) *Rosenkranz*, ebendaselbst **167**, H. 4—6, 320, 1927.

Physikalisch-chemische Untersuchungen bestrahlter Proteine.

II. Mitteilung:

Absorption des lichtdenaturierten Seralbumins im Ultraviolett.

Von

M. Spiegel-Adolf und **O. Krumpel.**

(Aus dem Laboratorium für Lichtbiologie und Lichtpathologie am physiologischen Institut der Universität und aus dem photochemischen Laboratorium der graphischen Lehr- und Versuchsanstalt in Wien.)

(Eingegangen am 31. Juli 1927.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

In dem Bestreben, verschiedene Denaturierungsprodukte der Proteine in physikalisch-chemischer Hinsicht zu charakterisieren, hat *Spiegel-Adolf*[1] in der ersten Mitteilung dieser Reihe einen Vergleich zwischen hitze- und lichtdenaturiertem Seralbumin durchzuführen versucht. Aus diesem scheint hervorzugehen, daß im Gegensatz zum Hitzeeinwirkungsprodukt das Lichtkoagulat tiefergehende, nicht mehr rückgängig zu machende Veränderungen erfahren hat.

Nach den grundlegenden Untersuchungen von *Hartley*[2], welcher das Verhalten der Absorption zur Lösung von Konstitutionsfragen verwendet hat, war zu erwarten, daß die Modifikationen lichtveränderter Albumine auch in den Absorptionskurven gegenüber denjenigen genuiner Albumine zum Ausdruck kommen werden. Einer Anregung von *W. Hausmann* folgend, haben wir daher die Absorption im Ultraviolett bei bestrahltem und unbestrahltem Seralbumin einer Untersuchung unterzogen, deren Ergebnisse den Inhalt der vorliegenden Mitteilung bilden.

Untersuchungen des Absorptionsvermögens der Eiweißkörper haben *Soret*[3], *Hartley*[4], *Blyth*[5], in besonders eingehender Weise *Dhéré*[6] ausgeführt

---

[1] *M. Spiegel-Adolf*, diese Zeitschr. **186**, 181, 1927.

[2] *W. N. Hartley*, vgl. *Smiles-Herzog*, Chemische Konstitution und physikalische Eigenschaften. Dresden und Leipzig 1914.

[3] *J. L. Soret*, Arch. des sciences phys. et nat., 3. période, **10**, 429 bis 495, 1883.

[4] *W. N. Hartley*, Journ. of the Chem. Soc. **51** (Transactions), 58, 1887.

[5] *A. W. Blyth*, ebendaselbst **75** (Transactions), 1162, 1899.

[6] *C. Dhéré*, Recherches spectrographiques sur l'absorption des rayons ultra-violets par les albuminoides, les proteides et leurs derivés. Thèse, Fribourg (Suisse) 1909.

und gezeigt, daß die Proteine ein starkes Absorptionsvermögen für Ultraviolett aufweisen. Diese Angaben wurden durch alle späteren Versuchsergebnisse bestätigt (z. B. *Abderhalden* und *Haas*[1]). Vor allem *Dhéré* verdanken wir genaue Angaben über die Lage der hauptsächlichen Absorptionsbanden sowie über die Verschiebung, welche diese bei Reaktionsänderungen des Eiweißes erfahren.

Notwendige Voraussetzung für eine spektrographische Untersuchung bestrahlter Proteine, über welche Daten bislang nicht vorzuliegen scheinen, waren die in der I. Mitteilung dieser Reihe gesammelten Erfahrungen. Danach war es möglich, durch Wahl passender Zusätze den Eintritt sichtbarer Veränderungen in Eiweißlösungen zu verhindern, trotzdem diese eine Bestrahlung mit der Quarz-Hg-Dampflampe erfahren hatten, welche zur vollständigen Fällung von reinem Eiweiß genügt hätte.

Daß dennoch eine nachweisbare Einwirkung auf das Protein erfolgt, geht daraus hervor, daß dieses nach Beseitigung der Zusätze sich als irreversibel verändert erweist.

Das zur Verwendung kommende Eiweißmaterial war ein durch Dialyse und Elektrodialyse bei wiederholtem Salzzusatz (*M. Adolf* und *Wo. Pauli*[2]) aus Pferdeserum hergestelltes Seralbumin, dessen Trockengehalt 0,44%, spezifische Leitfähigkeit $K = 5{,}46 \cdot 10^{-6}$, Wasserstoffionenaktivität $c_H = 5{,}30 \cdot 10^{-6}$, Aschengehalt 0,04% betrug. An dem gleichen Präparat, das somit im Gegensatz zur Versuchsanordnung von *Abderhalden* und *Haas* nicht auf isoelektrische Reaktion gebracht worden war, wurden seinerzeit die Ultraviolettbestrahlungsversuche ausgeführt. Ebenso wurde auch die bei letzteren verwendete Lichtquelle wieder in Gebrauch genommen. Es war dies der nicht mehr ganz neue Brenner einer Quarz-Hg-Dampflampe (*Heraeus*, Hanau), welche, mit 220 Volt Gleichstrom betrieben, einen Stromverbrauch von 2,5 Ampère aufweist. Die gebrauchte Lampentype war *Bach*-Höhensonne mit einfachem Gehäuse ohne untere Halbkugelhälfte.

Entsprechend der in der genannten Arbeit verwendeten Versuchsanordnung wurde das Seralbumin mit den gerade die Lichtkoagulation verhindernden Mengen von Säure und Lauge versetzt, derart, daß die Endnormalität einer 0,4%igen Lösung 0,004 n Säure oder Lauge betrug, und in einer Entfernung von 20 cm in Quarzgefäßen unter Wasserkühlung durch 5½ Stunden bestrahlt, also unter Bedingungen gebracht, welche nach den gemachten Erfahrungen die vollständige Koagulation von elektrolytfreiem Seralbumin gleicher Konzentration bewirken. Außer diesen bestrahlten Lösungen wurden noch unbestrahlte gleicher Zusammensetzung zur spektrographischen Unter-

[1] *E. Abderhalden* und *R. Haas*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **155**, 195, 1926; **160**, 256, 1926 (daselbst auch neuere Literatur).

[2] *M. Adolf* und *Wo. Pauli*, diese Zeitschr. **152**, 360, 1924.

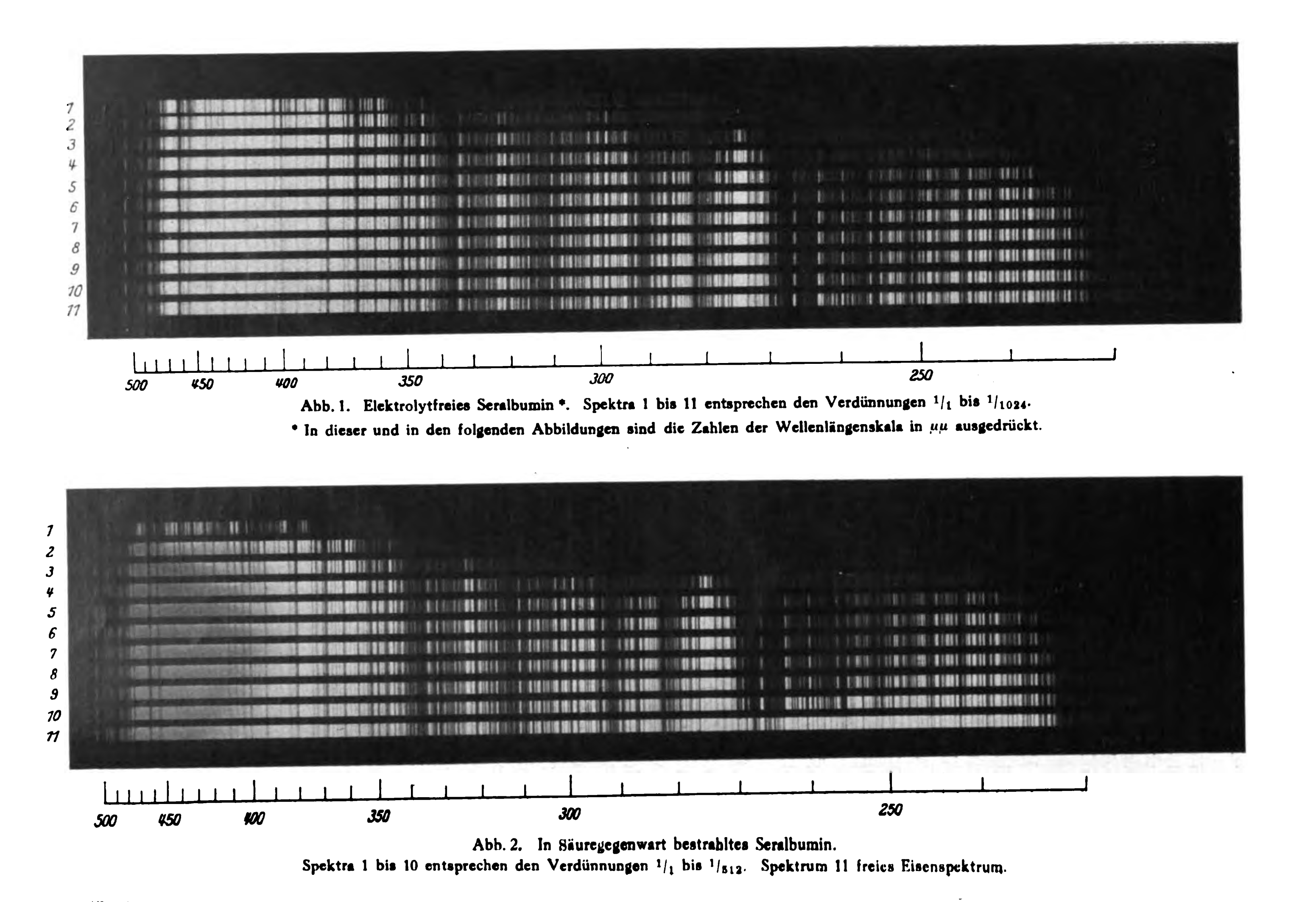


Abb. 1. Elektrolytfreies Seralbumin *. Spektra 1 bis 11 entsprechen den Verdünnungen $^1/_1$ bis $^1/_{1024}$.

* In dieser und in den folgenden Abbildungen sind die Zahlen der Wellenlängenskala in $\mu\mu$ ausgedrückt.

Abb. 2. In Säuregegenwart bestrahltes Seralbumin.

Spektra 1 bis 10 entsprechen den Verdünnungen $^1/_1$ bis $^1/_{512}$. Spektrum 11 freies Eisenspektrum.

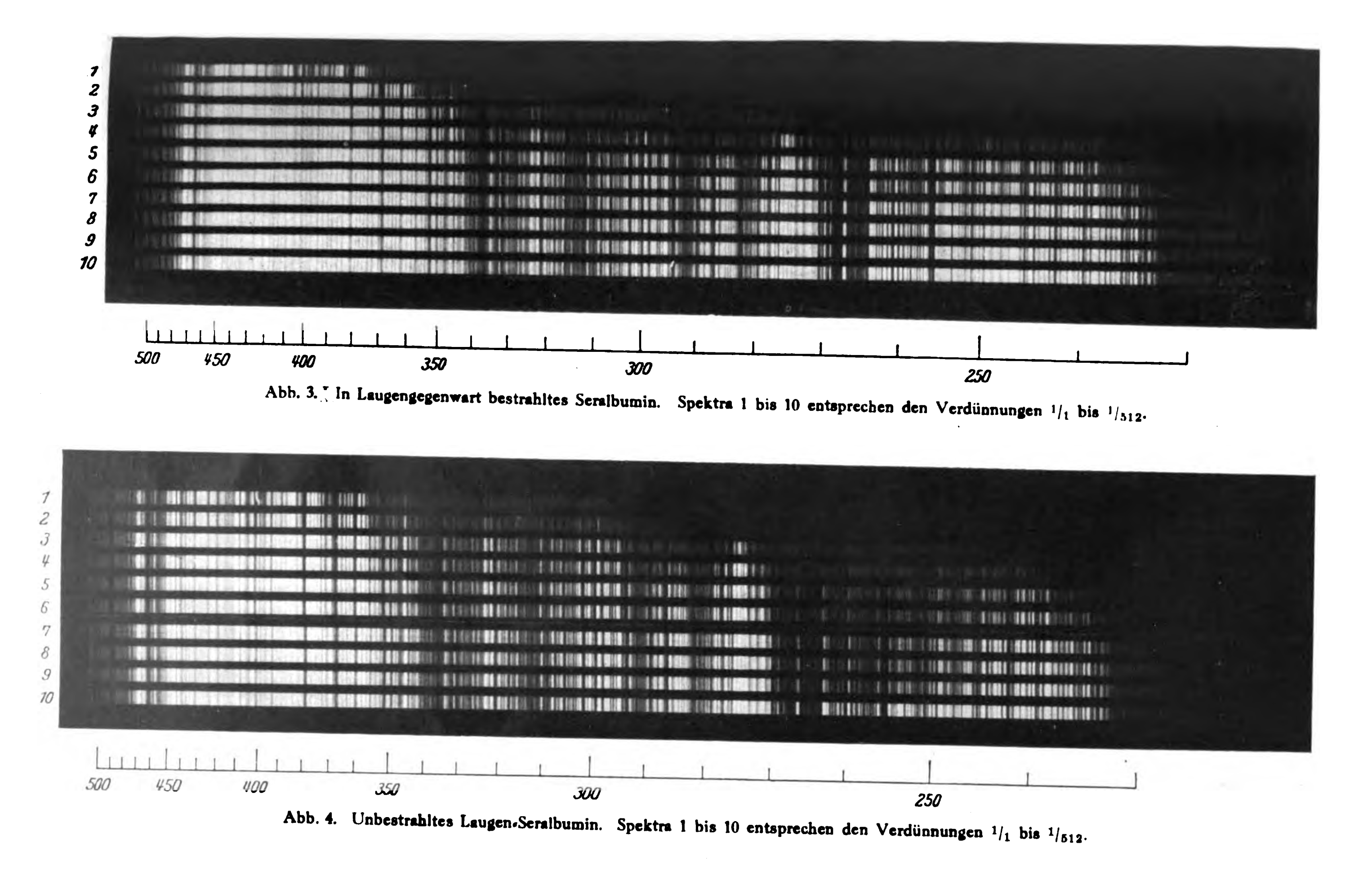


Abb. 3. In Laugengegenwart bestrahltes Seralbumin. Spektra 1 bis 10 entsprechen den Verdünnungen $^1/_1$ bis $^1/_{512}$.

Abb. 4. Unbestrahltes Laugen-Seralbumin. Spektra 1 bis 10 entsprechen den Verdünnungen $^1/_1$ bis $^1/_{512}$.

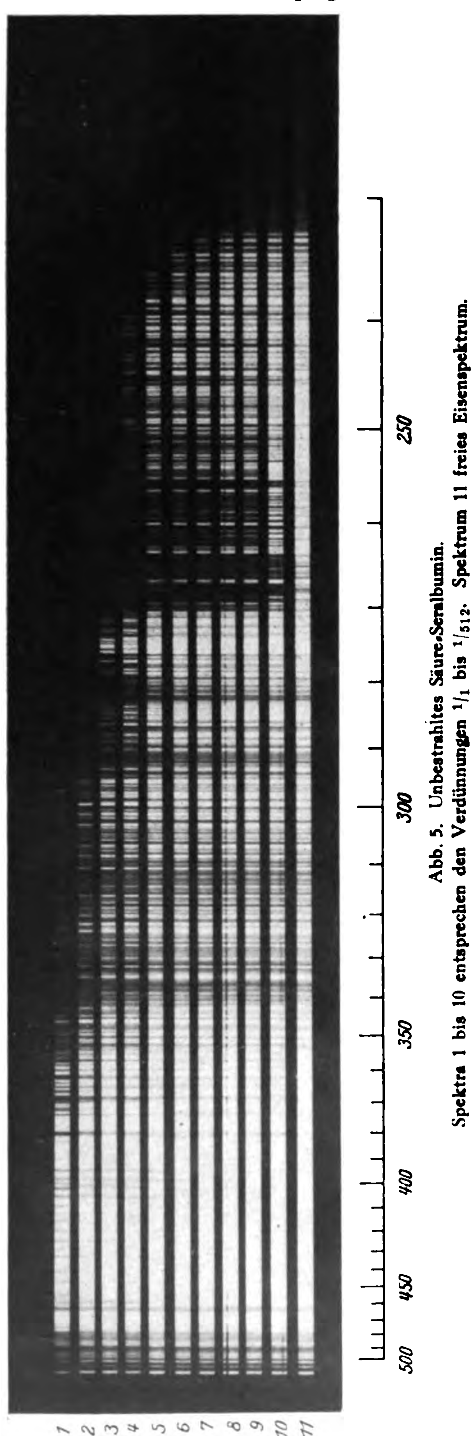


Abb. 5. Unbestrahltes Säure-Seralbumin.
Spektra 1 bis 10 entsprechen den Verdünnungen $^1/_1$ bis $^1/_{512}$. Spektrum 11 freies Eisenspektrum.

suchung herangezogen. Da nun nach älteren Angaben Säure und Laugenzusätze in bestimmtem entgegengesetzten Sinne im Spektrum der Proteine zum Ausdruck kommen, wurde, um einen Vergleich der vorliegenden Befunde mit den in der Literatur angeführten, welche das genuine Protein betreffen, zu ermöglichen, auch eine spektrographische Aufnahme des elektrolytfreien Seralbumins gegeben.

Die Untersuchungen wurden mit einem großen Quarzspektrographen ausgeführt. Als Lichtquelle diente ein zwischen Eisenelektroden überschlagender Funke eines großen *Ruhmkorff*schen Induktoriums, wobei die Spannung allerdings nicht konstant gehalten werden konnte. Die Quarzküvette gestattete die Untersuchung einer Schichtdicke von 11 mm; die Verdünnungsreihen der Eiweißlösungen wurden mit destilliertem Wasser hergestellt. Die Expositionszeit betrug in allen Fällen 30 Sekunden, so daß in den ursprünglich unbestrahlten Eiweißlösungen etwa eintretende chemische Umwandlungen wahrscheinlich vollständig vernachlässigt werden dürften (s. weiter unten). Die Bestimmung der Wellenlängen erfolgte auf graphischem Wege unter Zuhilfenahme der Tabellen von *Eder - Valenta*, Atlas typischer Spektren.

Die auf diese Weise erhaltenen Aufnahmen sind in den Abb. 1 bis 5 wiedergegeben.

In allen diesen Aufnahmen entsprechen die zehn ersten Spektren den Verdünnungsreihen der jeweiligen Eiweißlösung. In den Abb. 2, 4, 5 entspricht das elfte Spektrum demjenigen des freien Eisenfunkens, dagegen stellt das elfte Spektrum in der Abb. 1 die Aufnahme bei einer Verdünnung der Eiweißlösung von 1 : 1024 dar. Die Ergebnisse der spektrographischen Untersuchung sind in der beigegebenen Tabelle (S. 40) zusammengestellt. In dieser entsprechen die zehn Horizontalabschnitte den einzelnen Spektren bei Verdünnung 1/1 bis 1/512, die fünf Vertikalabteilungen den Aufnahmeserien 1 bis 5. Diese letzteren sind dreifach unterteilt. Innerhalb einer Aufnahmeserie bedeuten die Zahlen der Mittelkolonne die Reichweite der Spektren bzw. die Wellenlängen, bei denen die Spektrallinien eben verschwinden oder frisch auftauchen. Infolge der Bandenbildungen sind in den Horizontalabschnitten 2, 3, 6 mehrere Zahlen angegeben. Die Differenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden Werten dieser Kolonne gibt somit zuerst die Breite einer Absorptionsbande, deren beiläufiges Maximum in der links davon stehenden ersten Vertikalreihe eingetragen ist, hierauf den Strahlenbereich des folgenden durchgelassenen Teiles des Spektrums, dessen intensivster Anteil, welcher dem Absorptionsminimum entspricht, in der rechtsstehenden dritten Kolonne enthalten ist.

Es muß an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß wegen der Eigenart der verwendeten Lichtquelle es vorläufig nicht möglich war und auch den Rahmen dieser Arbeit überschreiten würde, alle angeführten Maxima und Minima auf das Eiweiß zu beziehen. Auch *Dhéré* hat schon seine Bedenken gegen die alleinige Verwendung von Eisenfunken zu spektrographischen Untersuchungen von Proteinen ausgesprochen. In der vorliegenden Untersuchung sollte jedoch zunächst von einer Untersuchung des Eiweißspektrums an sich abgesehen und nur ein Vergleich zwischen den Spektren bestrahlten und unbestrahlten Seralbumins gezogen werden. Der Versuch einer Identifizierung der Maxima und Minima in den Spektren verschiedener Eiweißlösungen muß einer späteren, mit vervollkommneter Methodik ausgeführten Untersuchung vorbehalten bleiben.

Zur besseren Veranschaulichung wurden die in der Tabelle angeführten Werte graphisch dargestellt (vgl. Abb. 6), wobei die Wellenlänge als Abszisse, die Konzentration als Ordinate verwendet wurden. Gegenüber der Tabelle wurden in der graphischen Darstellung zur größeren Übersichtlichkeit nur jene Maxima und Minima eingezeichnet, welche nicht in Zusammenhang mit den Lücken des Eisenfunkenspektrums zu stehen scheinen.

Versuchen wir zunächst die hier gegebenen Resultate zu beurteilen, so soll aus den angedeuteten Gründen von einer quantitativen Analyse und Beurteilung der Spektren an sich zunächst Abstand genommen

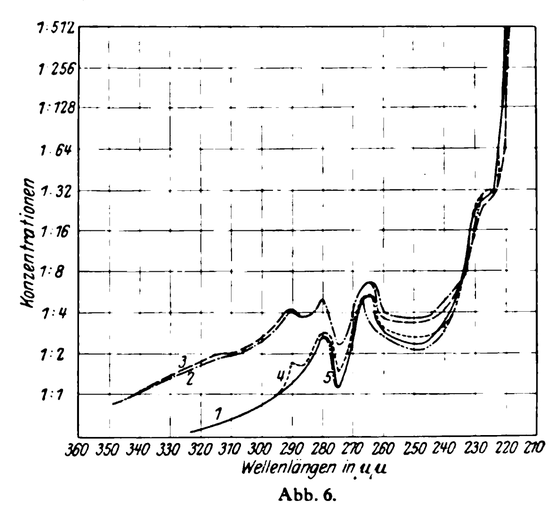


Abb. 6.

Absorptionskurven von 1. reinem Seralbumin, 2. in Säuregegenwart bestrahltem Seralbumin, 3. in Laugengegenwart bestrahltem Seralbumin, 4. unbestrahltem alkalischen, 5. unbestrahltem sauren Seralbumin.

werden. Hingegen dürften diese Bedenken sich nicht auf Ergebnisse beziehen, die durch Vergleich der einzelnen, unter gleichen Versuchsbedingungen hergestellten Spektren gewonnen werden.

Betrachten wir nun zunächst die Spektra der unbestrahlten Eiweißlösungen, so zeigt sich, daß diese nur geringe Differenzen untereinander aufweisen. Nur angedeutet erscheint die Erscheinung, daß das neutrale Seralbumin bezüglich der Reichweite seines Absorptionsspektrums eine Mittelstellung zwischen dem alkalischen und dem sauren Seralbumin einnimmt. Das Absorptionsspektrum des ersteren erscheint gegen das Gebiet größerer Wellenlängen, dasjenige des sauren in das Bereich kurzwelliger Strahlen verschoben zu sein.

Noch viel geringer erscheinen die Unterschiede, welche die Absorptionsspektra der in Säure- und Laugengegenwart bestrahlten Eiweißlösungen aufweisen, so daß diese als praktisch zusammenfallend aufgefaßt werden können. Vergleicht man nun die Absorptionsspektra der bestrahlten und der unbestrahlten Eiweißlösungen, so zeigen sich hingegen deutlich wahrnehmbare Verschiedenheiten. Innerhalb eines Strahlungsbezirkes, dessen Wellenlänge von 400,0 bis 267,5 $\mu\mu$ reicht, hat das Absorptionsvermögen der bestrahlten gegenüber der unbestrahlten Eiweißlösung zugenommen. Die Lage der Absorptionsmaxima und -minima hat dabei augenscheinlich keine

Veränderung erfahren, nur werden die gleichen Werte bei den bestrahlten Lösungen bereits in niedrigeren Konzentrationen erreicht als bei den genuinen. Während z. B. bei den beiden bestrahlten Lösungen in der Konzentration 1/4 ein Absorptionsmaximum bei etwa 280,0 $\mu\mu$ auftritt, wird es bei den unbestrahlten erst bei der Konzentration 1/2 nachweisbar.

Zur leichteren Veranschaulichung dieser Verhältnisse sind in der Abb. 7 Spektra der verschiedenen hier untersuchten Eiweißlösungen bei gleicher Konzentration nebeneinandergestellt worden. Betrachtet man die Spektren ohne Legende, so dürfte es wohl den Anschein erwecken, als bestünde lediglich ein Konzentrationsunterschied, nicht aber eine durch eine Modifikation des Eiweißmoleküls bedingte optische Veränderung genuiner Eiweißlösungen durch die Bestrahlung.

Versuchen wir, die hier gebrachten Tatsachen mit den in der Literatur vorliegenden Angaben zu vergleichen und auf diesem Wege womöglich zu einem Verständnis der bei der Einwirkung kurzwelliger Strahlen am Eiweißmolekül hervorgerufenen Veränderungen zu kommen, so zeigt sich, daß nur für das Verhalten von Proteinen bei Säure- und Laugenzusatz bislang Erfahrungen gesammelt worden sind. Nachdem als erster *Soret* auf die charakteristische Beeinflussung des Eiweißspektrums durch Alkalizusatz hingewiesen hat, hat *Dhéré* dieses Verhalten bei verschiedenen Proteinen untersucht und festgestellt, daß in der Reihenfolge Alkaliprotein, neutrales Protein, saures Protein das Absorptionsgebiet gegen das kurzwellige Ende des Spektrums rückt. Unsere Befunde können somit diejenigen von *Dhéré* bestätigen. Wenn aber bei diesem Autor die Erscheinungen viel deutlicher sind als in unserem Falle, so dürfte es darauf zurückführbar sein, daß wir mit viel geringeren Mengen von Säure und Alkali gearbeitet haben. Auf gleichen Eiweißgehalt bezogen, haben wir nur etwa ein Fünftel der von *Dhéré* verwendeten Alkalimenge gebraucht, da es uns daran lag, einen Überschuß der letzteren aus doppeltem Grunde zu vermeiden. Zunächst um eine sekundäre Beeinflussung des Denaturierungsvorgangs am Protein zu vermeiden, und zweitens, um ein Spektrum zu erhalten, das möglichst ähnlich demjenigen des genuinen Proteins sei. Außerdem hat *Dhéré* bei gleichen Konzentrationen in verschiedenen Schichtdicken gearbeitet, so daß der Variationsbereich ein engerer wird und dadurch die Unterschiede auffälliger hervortreten. *Dhéré* hat wohl auf das ähnliche Verhalten gewisser Aminosäuren bei Laugenzusatz hingewiesen, jedoch keine Erklärung der obigen Erscheinung zu geben versucht. Nach der Auffassung von *Wo. Ostwald*[1] soll sie unter der Voraussetzung, daß alkalisches Albumin gröber dispers ist als neutrales

[1] *Wo. Ostwald*, Licht und Farbe in Kolloiden. Dresden u. Leipzig 1924.

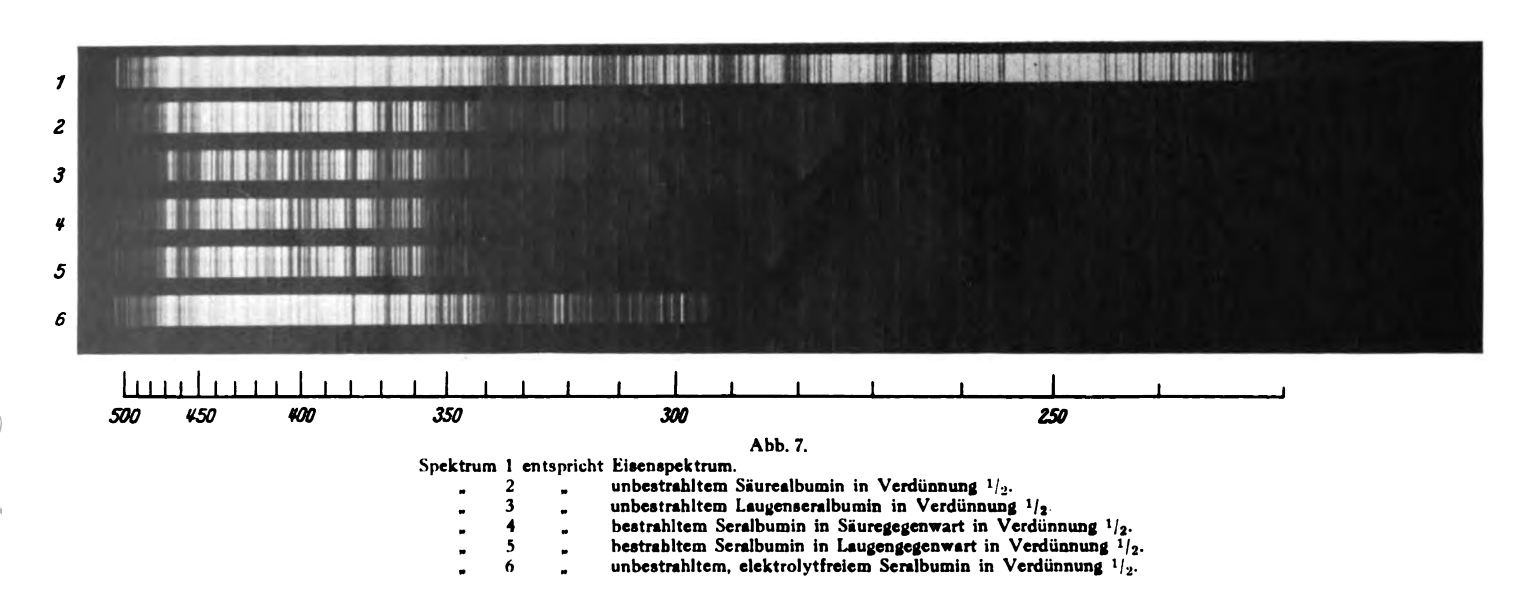


Abb. 7.

Spektrum 1 entspricht Eisenspektrum.
" 2 " unbestrahltem Säurealbumin in Verdünnung $^1/_2$.
" 3 " unbestrahltem Laugenseralbumin in Verdünnung $^1/_2$.
" 4 " bestrahltem Seralbumin in Säuregegenwart in Verdünnung $^1/_2$.
" 5 " bestrahltem Seralbumin in Laugengegenwart in Verdünnung $^1/_2$.
" 6 " unbestrahltem, elektrolytfreiem Seralbumin in Verdünnung $^1/_2$.

oder saures, den Ausdruck für die Tatsache bilden, daß die ultraviolette Auslöschung mit abnehmendem Dispersitätsgrad sich nach den größeren Wellenlängen ausbreitet. Ohne daß hier versucht werden soll, eine befriedigende Theorie für diesen Vorgang aufzustellen, sei doch in diesem Zusammenhang auf gewisse Tatsachen hingewiesen. Bekanntlich nimmt *Pauli*[1] an, daß für die Alkalibindung an Eiweiß außer den endständigen Carboxylgruppen auch die Stelle der Peptidbindung in Betracht kommt; aus dem zeitlichen Verlauf der Alkalibindung schließt nun derselbe Verfasser, daß sich dabei erst unter dem Einfluß von Alkali ein Teil der Ketoform in die Enolform umlagert. Nun haben *Abderhalden* und *Haas* an Leucylglycyl gezeigt, daß die Enol- und die Ketoform sich durch ihre Absorption im Ultraviolett unterscheiden, indem nur die erstere ein Bandenspektrum (zwischen 276,0 bis 332,0 $\mu\mu$) aufweist, während die Ketoform hauptsächlich Endabsorption zeigt.

Die weitgehende Übereinstimmung im Absorptionsspektrum des in Säure- und des in Laugengegenwart lichtveränderten Seralbumins ist gut mit den in der I. Mitteilung dieser Reihe erhobenen Befunden vereinbar. Denn dort wurde festgestellt, daß im Gegensatz zum Verhalten der hitzeveränderten Proteine[2], bei welchen das unter vergleichbaren Verhältnissen in HCl-Gegenwart erhitzte Seralbumin zum größten Teile der Denaturierung entgeht, bei der Lichteinwirkung HCl- und NaOH-Zusatz in gleichem Sinne wirksam sind: sie verhindern nur die Koagulation, nicht aber die Denaturierung. Damit soll natürlich ebensowenig behauptet werden, daß die beiden Produkte oder ihre Absorptionsspektra identisch seien.

Von ganz besonderem Interesse dürfte die Art der Verschiedenheit sein, welche zwischen den Spektren der bestrahlten und der unbestrahlten Eiweißlösung besteht. Wenn auch ein Schluß auf die bei der Bestrahlung erfolgten Veränderungen am Eiweißmolekül bei dem jetzigen Stande unserer Kenntnisse nicht möglich erscheint, so mögen dennoch zwei dahingehörige Fragenkomplexe gestreift werden.

Bekanntlich hat *Dhéré* auf die große Übereinstimmung im Spektrum der Proteine und demjenigen der aromatischen Aminosäuren, besonders des Tyrosins hingewiesen und einen kausalen Zusammenhang vermutet; in ähnlicher Weise haben unlängst *Steenström* und *Reinhard*[3] angegeben, daß dieselben Aminosäuren die starke Ultraviolettabsorption des Serums verursachen. Andererseits haben mehrere Autoren (so *Harris*[4],

---

[1] *Wo. Pauli*, Kolloidchemie der Eiweißkörper. Dresden u. Leipzig 1922.
[2] *M. Spiegel-Adolf*, diese Zeitschr. **170**, 126, 1926.
[3] *N. Stenström* und *M. Reinhard*, Journ. of biol. Chem. **66**, 1819, 1925; ref. Chem. Centralbl. **1926**, I, S. 2536.
[4] *D. Th. Harris*, Biochem. Journ. **20**, 288, 1926.

Lieben[1]) gezeigt, daß Tyrosin und Tryptophan bei der Einwirkung kurzwelliger Strahlen in Sauerstoffgegenwart zerstört werden. Die Versuchsbedingungen des letzteren Autors waren in gewissem Grade mit den unserigen vergleichbar. Aus der spektrographischen Untersuchung des bestrahlten Seralbumins scheint also hervorzugehen, daß, falls die angeführten Angaben der genannten Autoren zu Recht bestehen, entweder das Absorptionsspektrum dieses Proteins nicht von seinem Bestand an aromatischen Aminosäuren abhängig ist, oder, was wahrscheinlicher erscheint, daß die genannten Aminosäuren bei Bestrahlung in freiem Zustande anders reagieren, als wenn sie Bestandteile des Seralbuminmoleküls bilden. Ob diese Reaktionsunterschiede vorwiegend qualitativer oder quantitativer Natur und wieweit sie von dem verwendeten Eiweißmaterial abhängig sind, soll den Gegenstand fernerer Untersuchungen bilden. Gegenüber den neuesten Ergebnissen von *Lieben*[2], wonach Tyrosin und Tryptophan auch im Eiweißverband bei Einwirkung der Strahlung der Quarzquecksilberdampflampe zerstört werden, wenn auch langsamer als im freien Zustande, muß auf folgendes hingewiesen werden. Zunächst scheint dieser Autor im vorliegenden Falle eine intensivere Bestrahlungsweise angewendet zu haben. Ferner muß, was das von *Lieben* verwendete Material, Pepton und Casein, anbelangt, hervorgehoben werden, daß das Casein sich von den übrigen Eiweißkörpern durch seine leichte Spaltbarkeit unterscheidet (vgl. *O. Kestner*[3], Literatur ebendaselbst).

Am sinnfälligsten drängt sich bei der Betrachtung der Kurve und der Spektren die Tatsache auf, daß sich spektroskopisch das bestrahlte Eiweiß gegenüber dem unbestrahlten so verhält, als wenn es konzentrierter wäre.

Es erscheint wohl, wie bereits angedeutet worden ist, als gänzlich unwahrscheinlich, daß das veränderte optische Verhalten der bestrahlten Eiweißlösungen teilweise oder ganz erst unter der Einwirkung des als Lichtquelle verwendeten Eisenfunkens entsteht. Zwar hat *Pohl*[4] an Kristallen Erfahrungen gesammelt, die auf die Möglichkeit einer Änderung des Absorptionsspektrums unter dem Einfluß des absorbierten Lichtes während der Aufnahme des Spektrogrammes hindeuten. Abgesehen von der Gewagtheit, Resultate, die an Kristallen gewonnen worden sind, auf Eiweißsole zu übertragen, spricht die im Verhältnis zur Expositionszeit beträchtliche ursprüngliche Bestrahlungszeit sowie das

---

[1] *F. Lieben*, diese Zeitschr. **184**, 453, 1927.
[2] *F. Lieben*, diese Zeitschr. **187**, 307, 1927.
[3] *O. Kestner*, Chemie der Eiweißkörper, Braunschweig 1925.
[4] *R. Pohl*, Die Naturwissenschaften **15**, 433, 1927.

Verhalten der unbestrahlten Kontrollösung bei der spektrographischen Aufnahme gegen die obige Annahme.

Trotzdem dürfte es von Interesse sein, daß das verschiedene Absorptionsvermögen bestrahlter und unbestrahlter Eiweißlösungen noch auf andere Weise festgestellt werden kann. *Spiegel-Adolf* hat nämlich in gemeinsamer Untersuchung mit *W. Hausmann*[1] gezeigt, daß, falls die genannten Lösungen als Filter verwendet werden, die vorbestrahlten Eiweißlösungen biologischen Objekten einen weit intensiveren Lichtschutz gegen kurzwellige Strahlen verleihen als ursprünglich unbestrahltes Eiweiß. Möglicherweise steht mit diesen Erscheinungen auch die unter anderem von *Hallauer*[2] erwähnte Tatsache in Zusammenhang, daß die Absorptionskraft der menschlichen Linse für kurzwelliges Licht mit zunehmendem Alter wächst.

Vergleiche des Absorptionsvermögens von bestrahlten und unbestrahlten Seralbuminlösungen scheinen bislang in der Literatur nicht vorzuliegen. Ob das hier angegebene Verhalten für alle Eiweißkörper charakteristisch sei, kann erst nach weiteren Untersuchungsergebnissen festgestellt werden. Ein Nichteiweißkörper, das biologisch bedeutsame Ergosterin, zeigt bekanntlich das entgegengesetzte Verhalten, indem es nach den angeführten Resultaten von *Pohl* nach der Bestrahlung mit kurzwelligem Lichte die Absorptionsbanden im Ultraviolett verliert. Aber auch Eiweißabbauprodukte, so Pepton, zeigen nach noch nicht abgeschlossenen Untersuchungen von *Hausmann* und *Krumpel* über die Absorptionsverhältnisse bestrahlter Tuberkuline ein vom Seralbumin verschiedenes Verhalten.

Wir sind daher vorderhand nicht imstande, eine Erklärung für das gesteigerte Absorptionsvermögen bestrahlter Seralbuminlösungen zu geben, ja wir wagen nicht einmal, die Richtung anzudeuten, in welcher eine solche zu suchen ist. Es soll nur auf einen gewissen Analogiefall bei Aminosäuren hingewiesen werden, den wir den schönen Untersuchungen von *Abderhalden* und *Haas* entnehmen. Diese Autoren haben nämlich in ihren spektrographischen Untersuchungen von Aminosäuren gezeigt, daß die Dioxypiperazine im allgemeinen stärker absorbieren als die ihnen entsprechenden Dipeptide. Die Anhydridbildung scheint demnach mit einer Verstärkung der Absorptionsfähigkeit einherzugehen. Nun haben zwar *C. Neuberg*[3] und andere Autoren die durch die Bestrahlung am Eiweiß hervorgebrachren Veränderungen auf Grund des Nachweises von Abbauprodukten als Hydrolyse nach-

---

[1] *W. Hausmann* und *M. Spiegel-Adolf*, erscheint in der Klin. Wochenschrift.

[2] *O. Hallauer*, klin. Monatsbl. f. Augenheilkde. **47**, 721, 1909.

[3] *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **13**, 305, 1908; **29**, 279, 1910.

Tabelle[1].

Konz.	Aufnahme 1 Rein. Seralbumin			Aufnahme 2 In Säuregegenwart bestrahltes Seralb.			Aufnahme 3 In Laugengegenwart bestrahltes Seralb.			Aufnahme 4 Unbestrahltes Seralb. in Laugengegenwart			Aufnahme 5 Unbestrahltes Seralb. in Säuregegenwart		
	Abs. Max.	Reichweite	Abs. Min.	Max.	Reichweite	Min.	Max.	Reichweite	Min.	Max.	Reichweite	Min.	Max.	Reichweite	Min.
1		**2948**			**3418**			**3418**			**2948**			**2948**	
2		**2829**						(3154)			2912			**2829**	
	2800				**3076**			**3100**		2905			**2800**		
		2770									2895			**2779**	
			2750									2875			**2750**
		2715									**2840**			**2715**	
										2800					
											2762				
												2750			
											2728				
3		**2684**			**2912**			**2927**			**2684**			**2684**	
	2675			**2905**			**2905**			**2675**			**2675**		
		2665/7	2665/7		**2895**			**2884**			2665/7	2665/7		**2665/7**	
	2645					**2857**			**2857**	**2645**					2600
		2632			**2829**			**2829**			**2632**			2564	
			2600	**2800**			**2800**					2600	2560		
		2564			**2779**			**2779**			2564			2556	
	2560					**2750**			**2750**	2560					**2490**
		2556			**2704**			**2701**			2556			**2378**	
			2490	(2675)			2675					**2490**			
		2393			2632	2632		2665/7	2665/7		**2378**				
				(2612)			**2645**								
					2600	2600		**2632**							
				(2580)					**2490**						
					2564			**2420**							
						2490									
					2445										
4		**2340**			**2331**			**2340**			**2340**			**2340**	
5		**2323**			**2327**			**2306**			**2323**			**2306**	
6		**2247**			**2247**			**2239**			2270			2270	
										2260			2260		
											2256			2256	
												2245			2245
											2239			**2239**	
7		**2228**			**2228**			**2212**			**2228**			**2228**	
8		**2212**			**2218**			**2209**			**2218**			**2218**	
9		**2212**			**2209**			**2204**			**2209**			**2209**	
10		**2209**			**2204**			**2202**			**2204**			**2204**	

[1] Die Wellenlängen sind in Ångström-Einheiten angegeben. 1 Ångström = 0,1 $\mu\mu$. — Die fettgedruckten Werte sind in Abb. 6 graphisch dargestellt.

gewiesen. Es dürfte aber damit nicht im Widerspruch stehen, wenn man das damit parallel gehende Unlöslichwerden des Proteins auf eine Anhydridbildung des Eiweißes bezieht.

Zusammenfassung.

1. In der vorliegenden Arbeit werden Absoıptionsspektren des elektrolytfreien Seralbumins, desselben Eiweißkörpers in Säure- und Laugengegenwart, sowie nach Bestrahlung mit der Quarz-Hg-Dampflampe bei den gleichen Elektrolytzusätzen in den kurzwelligen Strahlenbezirken mitgeteilt.

2. Es wird festgestellt, daß vorbestrahlte Eiweißlösungen in einem Strahlenbezirk von 400,0 bis 267,5 $\mu\mu$ ein stärkeres Absorptionsvermögen für kurzwellige Strahlen zeigen als nicht vorbestrahlte Kontrollösungen, ohne daß es nachweislich zu einer Verschiebung der Absorptionsmaxima- und minima kommt.

Die Untersuchungen sollen in verschiedenen Richtungen fortgesetzt werden.

Über den Einfluß des löslichen Kieselsäuregehalts der Böden auf die Resorption der Phosphorsäure durch die Pflanze.

Von

Antonín Němec.

(Mitteilung aus den Staatlichen Versuchsanstalten für Pflanzenproduktion in Prag.)

(Eingegangen am 4. August 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In der Pflanzenchemie wurde bisher der Kieselsäure meistens nur eine untergeordnete Bedeutung zugeschrieben, obzwar die Pflanzenasche eine mehr als beachtenswerte Menge an Kieselsäure enthält. Neben Natrium und Chlor wurde auch das Silicium zu den weniger wichtigen „nützlichen" Nährstoffen gerechnet, deren Anwesenheit im Nährsubstrat nicht unbedingt notwendig erscheint. Man hat zwar gewisse günstige Wirkungen der Kieselsäure auf die mechanische Ausbildung der Stengel und Halme vorausgesetzt, sonst aber angenommen, daß dieses Element in keiner Beziehung zum Stoffwechsel steht und auch zur Bildung bestimmter Pflanzenbestandteile nicht unbedingt in Anspruch genommen wird. Die Kieselsäurefrage wurde überhaupt lange Zeit viel vernachlässigt, so daß wir über die Bedeutung und Rolle des Siliciums als Pflanzennährstoff sehr wenig unterrichtet sind.

Die einzigen älteren Versuche, welche einiges Licht in die Frage der Kieselsäureernährung von Pflanzenorganismen bringen, sind die Untersuchungen von *Wolff* und *Kreutzhage* (1), welche bewiesen haben, daß durch die Anwesenheit von Kieselsäureverbindungen in Nährlösungen die Kornerträge bei Hafer wesentlich gesteigert wurden, während der Gesamtertrag an Pflanzensubstanz fast unverändert geblieben ist. In phosphorsäurearmen Nährlösungen hat Kieselsäure ähnlich wie Phosphorsäure gewirkt, und daraus wurde der Schluß gezogen, daß die Wirkung von Silicium in irgend einer Weise mit der Phosphorsäurewirkung im Zusammenhang steht, wobei die Kieselsäure auf die Stoffwanderung in das Korn wahrscheinlich einwirkt.

Systematische Untersuchungen über die pflanzenphysiologische Bedeutung von Kieselsäure bei der Ernährung der Getreidearten wurden erst im

Jahre 1906 von *Hall* und *Morison* (2) veröffentlicht. Während der in Rothamsted seit dem Jahre 1864 ausgeführten Feldversuche mit Gerste wurde auch die Düngerwirkung von löslichen Silikaten nebst Phosphaten und anderen Pflanzennährstoffen verfolgt. Die Mehrerträge der mit löslichem Alkalisilikat gedüngten Parzellen, welche von Jahr zu Jahr auftraten, haben Anlaß zu eingehenden Untersuchungen über die physiologische Funktion der Kieselsäure bei der Ernährung der Gerste gegeben. Die Ergebnisse der ausgeführten Feldversuche, Wasserkulturenversuche und Analysen von Pflanzenaschen haben kurzgefaßt zu folgenden Schlußfolgerungen geführt:

1. Die Kieselsäure, welche zwar nicht einen der hauptsächlichen Bestandteile der Pflanzennährstoffe vorstellt, spielt jedoch eine wichtige Rolle in der Ernährung von Getreidearten wie Gerste, welche normalerweise in ihrer Aschensubstanz eine bedeutende Menge an Silicium enthalten. 2. Die Zugabe von löslichen Kieselsäureverbindungen in das Nährsubstrat bewirkt ihrerseits eine frühere Ausbildung und gleichzeitig erhöhte Erträge an Körnern und ist dadurch der Wirkung von Phosphorsäure ähnlich. *Die Kieselsäure bewirkt eine gesteigerte Phosphorsäure-assimilation durch die Pflanze*; die Steigerungen der Ernteerträge und der früheren Reife sind der vermehrten Phosphorsäureaufnahme zuzuschreiben. 3. Es ist kein Grund, anzunehmen, daß innerhalb der Pflanze die Kieselsäure eine bessere Ausnutzung der bereits assimilierten Phosphorsäure hervorruft oder eine Nährstoffwanderung in der Richtung vom Stroh zu Korn bewirken konnte. Der Sitz der Kieselsäurewirkung befindet sich innerhalb der Pflanze und nicht im Boden.

Über die günstige Wirkung von Kieselsäure auf die Entwicklung von Pflanzenorganismen berichten weiter die Versuche von *Jennings* (3). In diesen Untersuchungen wurde der Einfluß von kolloidaler Kieselsäure auf die Erträge von Weizen in Wasserkulturen verfolgt. Die Nährlösung enthielt die notwendigen Nährstoffe (Kalknitrat, Kaliumchlorid, Magnesiumsulfat, Eisensulfat und Monokaliumphosphat) und außerdem eine Differenzzugabe von kolloidaler Kieselsäure. Die Ernteergebnisse sowie Aschenanalysen zeigten einen bedeutend günstigen Einfluß der Kieselsäurewirkung. Der Siliciumgehalt der in kieselsäurehaltigen Nährlösungen gezüchteten Weizenpflanzen wurde wesentlich gesteigert. Aus diesen Untersuchungen folgert *Jennings*, daß die Ertragsteigerung der direkten Absorption von Kieselsäure zuzuschreiben ist.

Unabhängig von diesen Untersuchungen wurden über die Bedeutung der Kieselsäure bei der Pflanzenernährung ausführliche Forschungen von *Lemmermann* und *Wiesmann* (4) eingeleitet. Durch die Ergebnisse dieser Studien wurde festgestellt, daß das Silicium in geeigneter Form imstande ist, unter bestimmten Verhältnissen die Erträge wesentlich zu steigern. Diese ertragsteigernde Wirkung der Kieselsäure trat am stärksten auf in Vegetationsgefäßen mit Sand, neben einer unzureichenden Phosphorsäuredüngung; erheblich geringer war sie, wenn es den Pflanzen an Kali mangelte und sie blieb aus, wenn es den Pflanzen an Stickstoff fehlte. Man kann demnach mit geringeren Phosphorsäuremengen durch eine Beigabe von Silicium höhere Ernten erzielen, so daß man auch sagen kann, Silicium wirkt bis zu einem gewissen Grade phosphorsäuresparend. Aber auch neben einer Düngung, die bereits größere Mengen von Phosphorsäure enthielt, wirkte Silicium in geeigneter Form noch günstig. Von den ge-

prüften Siliciumverbindungen (Kieselsäurehydrat, Kieselsäureanhydrid, verschiedene Kieselguren und Natronwasserglas) wirkte auf Quarzsand am besten die kolloidale Kieselsäure. Die Ergebnisse stimmen auch in der Richtung mit den früheren Versuchen überein, daß die günstige Wirkung der Kieselsäure nicht durch eine Einwirkung auf den Boden, sondern durch eine direkte Einwirkung auf die Pflanzen erklärt wird. *Die Kieselsäure wirkte jedoch bei Getreidearten ertragsteigernd nicht nur auf die Körnerernte, sondern auf alle Organe der Pflanzen ein.* Weiter wurde festgestellt, daß *die Kieselsäurewirkung sich nicht nur auf die Gramineen, sondern auch auf Leguminosen und Cruziferen erstreckt.* Je mehr Kieselsäure innerhalb der Versuchsbedingungen den Pflanzen im Versuchsmedium zur Verfügung stand, um so größer war die absolute Höhe der Erträge, um so geringer der Erntezuwachs, der durch eine verstärkte Phosphorsäuredüngung hervorgerufen wurde. Interessant ist weiter zu bemerken, daß in einem auf Kieselsäurezufuhr reagierenden Medium die in verschiedenen Düngemitteln verabreichte Phosphorsäure (Superphosphat, Thomasmehl, Rhenaniaphosphat) scheinbar um so besser wirkte, je höher zugleich der Gehalt der betreffenden Düngemittel an Kieselsäure war. Jedoch auch neben von Haus aus kieselsäurehaltigen Düngemitteln wurde durch Kieselsäuredüngung eine weitere Ertragsteigerung erzielt.

In einer weiteren Arbeit untersuchten *Lemmermann* und *Wiesmann* (5) die Ursache der ertragsteigernden Wirkung von Kieselsäure. Die Hauptergebnisse der Versuche wurden folgenderweise zusammengefaßt: Die Kieselsäure vermag den Ertrag der Pflanze erheblich zu steigern, wenn der Pflanze nur ungenügende Mengen von Phosphorsäure zur Verfügung stehen. Es wurde festgestellt, daß die ertragsteigernde Wirkung der Kieselsäure nicht mit einer besseren Befriedigung des sogenannten Aschenhungers bei ungenügender Phosphorsäurezugabe zusammenhängt. Es konnten auch keine *direkte* wachstumsfördernden Eigenschaften der Kieselsäure nachgewiesen werden. Die Ursache der beobachteten günstigen Wirkung der Kieselsäure ist vielmehr in einer durch sie bewirkten erhöhten Phosphorsäureaufnahme der Pflanze zu suchen. Die Kieselsäure wirkt also vom ernährungsphysiologischen Standpunkt aus (innerhalb der Pflanze) nicht phosphorsäuresparend, wohl aber vom düngertechnischen Standpunkt aus, insofern, als durch eine Beigabe von Kieselsäure die Aufnahme und Ausnutzung der Düngerphosphorsäure erhöht werden kann (wenn im Boden nicht genügend Kieselsäure vorhanden ist), so daß geringere Phosphorsäuremengen in der Düngung ausreichen, um unter Mitwirkung der Kieselsäure dieselben Erntemengen hervorzubringen, die ohne Kieselsäure nur durch höhere Phosphorsäuregaben zu erzielen sind. Die erhöhte Aufnahme der Phosphorsäure unter dem Einfluß der Kieselsäure (und damit ihre ertragsteigernde Wirkung) wird nicht nur durch Vorgänge innerhalb der Pflanze hervorgerufen, sondern steht im Zusammenhang mit der lösenden Wirkung, die die Kieselsäure auf die Bodenphosphate ausüben kann. Ob noch andere Umstände bei der Wirkung der Kieselsäure mitwirken (die Veränderungen der Permeabilität der Epidermiszellen durch Kieselsäurewirkung), kann heute noch nicht mit Sicherheit gesagt werden. Nach Untersuchungen von *Wiesmann* (6) hat weder die Kieselsäure, noch die erhöhte Phosphorsäuregabe verändernd auf den anatomischen Bau des Roggenhalms eingewirkt.

Über den Einfluß von kolloidaler Kieselsäure auf die Ausnutzung der Phosphorsäure durch die Pflanzen wurden weiter Wasserkulturversuche

von *Butkewitsch* (7) angestellt. Die Ergebnisse stimmen mit den *Lemmermann*schen völlig überein. Es wurde wahrgenommen, daß eine funktionelle Ersetzung der Phosphorsäure durch die Kieselsäure in den Pflanzen nicht zur Geltung kommt. Die günstige Einwirkung des Siliciums bei relativem Phosphorsäuremangel in der Nährlösung wird dadurch bedingt, daß die in der Lösung befindliche Kolloidsäure die Aufnahme der Phosphorsäure durch die Pflanzenwurzeln befördert. Die befördernde Wirkung der Kieselsäuresole auf die Diffusion der dialysierfähigen Anionen ließ sich nicht nur in den Versuchen mit den Pflanzen, sondern auch mit denen mit Kolloidmembranen beobachten. Diese Verhältnisse kommen in den angegebenen Fällen zum Vorschein als Resultat der Verwirklichung des „*Donnan*schen Membrangleichgewichts", wobei die kolloiden Kieselsäureanionen als dialysierunfähige Ionen fungieren.

Die Untersuchungen von *Lemmermann* wurden meistens als Vegetationsgefäßversuche im Quarzsand mit kolloidaler Kieselsäure ausgeführt. Einige Versuche haben jedoch auch *auf natürlichen Böden* die günstige Wirkung einer Kieselsäuredüngung bei gleichzeitigem Phosphorsäuremangel nachgewiesen (4). Schon *Lemmermann* hat die Vermutung ausgesprochen, daß die Kieselsäureverbindungen des natürlichen Bodens zum Teil in ähnlicher Weise wirken können, wie die zu den bisherigen Versuchen benutzte kolloidale Kieselsäure. An anderer Stelle bemerkt aber *Lemmermann* (5), daß in den meisten Böden wahrscheinlich der natürliche Kieselsäuregehalt ausreichend sein wird, was tatsächlich nach unseren Untersuchungen für die fruchtbaren Böden zutrifft. Der Gehalt an löslicher Kieselsäure in verschiedenen natürlichen Böden kann sich jedoch inzwischen sehr weiter Grenzen bewegen. Über den natürlichen Gehalt der Acker- und Waldböden an löslicher Kieselsäure wurden bisher keine systematischen Untersuchungen angestellt.

In der gegenwärtigen Arbeit will ich kurz über meine ausführlichen Untersuchungen berichten, in welchen der Gehalt an leicht abspaltbarer, wasserlöslicher Kieselsäure verschiedener Böden verfolgt, mit einigen anderen Bodeneigenschaften und besonders mit der Phosphorsäurebedürftigkeit nach der Methode von *Neubauer* (8) in Vergleich gesetzt wurde, um die Wirkung des natürlichen Kieselsäuregehalts von Böden auf die Intensität der Phosphorsäureassimilation und somit auf ihre ertragsteigernde Wirkung auch von anderer Seite zu erforschen.

Bestimmung des Kieselsäuregehalts in wässerigen Bodenextrakten.

Zur Bestimmung des Kieselsäuregehalts in wässerigen Bodenauszügen wurde die kolorimetrische Methode von *Bell* und *Doisy* (9) verwendet, welche ursprünglich für die Bestimmung von Phosphorsäure in Harn, Blut usw. ausgearbeitet wurde. Das Verfahren beruht auf der Reduktion von Silikomolybdän- und Phosphormolybdänsäuren durch alkalische Hydrochinonlösung zu Molybdänblau. Der Vergleich mit einer in gleicher Weise behandelten Standardlösung von kieselsaurem bzw. phosphorsaurem Kalium ergibt die Summe der Kiesel-

und Phosphorsäuremengen *. In derselben zur Untersuchung herangezogenen Lösung wird nun der Phosphorsäuregehalt nach der Methode von *Atkins* (10) oder *Fiske* und *Subbarow* (11) ermittelt. Da nach unseren Untersuchungen bei der kolorimetrischen Analyse nach dem Verfahren von *Bell* und *Doisy* die Intensität der blauen Verfärbung, hervorgerufen durch 1 mg Phosphor und 1 mg Silicium, sich wie Si : P = 1 : 0,44 verhält, kann der Gehalt an Kieselsäure nach Abzug der festgestellten Phosphorsäure leicht errechnet werden. In wässerigen Bodenextrakten ist meistens der Phosphorsäuregehalt geringer als die zulässige Fehlergrenze bei der Kieselsäurebestimmung nach dem kolorimetrischen Verfahren.

Bereitung der wässerigen Bodenextrakte.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden zwecks Herstellung von wässerigen Bodenauszügen stets 30 g lufttrockenen Bodens mit 100 ccm destillierten, absolut kiesel- und phosphorsäurefreien Wassers 1 Stunde extrahiert und nachher das Gemisch durch ein Faltenfilter Schleicher-Schüll (Nr. 603, hart) filtriert. Falls das Filtrat nicht völlig klar oder gelb verfärbt erscheint, ist es ratsam, zwecks Aufklärung bzw. Entfärbung eine Messerspitze von reiner phosphat- und kieselsäurefreier Tierkohle anzuwenden. Die Tierkohle muß im Blindversuch überprüft und die eventuelle Verfärbung bei der Bestimmung im Bodenextrakt abgezogen werden. Zu den eigentlichen kolorimetrischen Kieselsäure- und Phosphorsäurebestimmungen werden je 30 ccm des klaren Bodenauszugs abgemessen.

Bestimmung des Kiesel- und Phosphorsäuregehalts.

A. Lösung der Molybdänsäure in Schwefelsäure. 50 g chemisch reines Ammoniummolybdat werden allmählich in 1 Liter normaler, lauwarmer Schwefelsäure gelöst. Die verwendete Schwefelsäure muß absolut phosphorsäurefrei sein, was durch einen Blindversuch kontrolliert wird. Diese Lösung kann unbegrenzt lange aufbewahrt werden. Das Auftreten einer kleinen Menge vom weißen Niederschlag (Molybdänsäure) kann nicht stören. Der Niederschlag wird von der Lösung durch Dekantieren abgetrennt.

B. Hydrochinonlösung. In 1 Liter reinen destillierten Wassers werden 20 g chemisch reines Hydrochinon unter Zusatz von 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure gelöst. Nach längerem Stehen wird die Lösung infolge Bildung von einer kleinen Menge Chinon gelbbraun verfärbt. Eine geringe Verfärbung der Hydrochinonlösung kann bei der kolorimetrischen Bestimmung nicht stören, da durch die nachherige Zugabe von alkalischer Sulfitlösung das gebildete Chinon wieder reduziert wird. Diese Lösung soll in gut verschlossener, braun gefärbter Flasche aufbewahrt und vor Lichtzutritt geschützt werden.

C. Alkalische Sulfitlösung. 2 Liter von 20%iger Natriumcarbonatlösung werden mit 500 ccm einer 15%igen Natriumsulfitlösung vermischt und filtriert. Gegenwart von geringeren Kiesel- und Phosphorsäuremengen

* Ein ähnliches Verfahren hat *L. W. Winkler* (Zeitschr. f. angew. Chem. 27, 511, 1914) zur Bestimmung der Kieselsäure in natürlichen Wässern verwendet.

kann nicht stören, da die Salze der komplexen Molybdänsäuren in alkalischen Lösungen nicht gebildet werden. Diese Lösung soll vor jeder Bestimmung frisch bereitet werden.

D. Standardlösung. Zum Vergleich im Kolorimeter wird eine Standardlösung von kieselsaurem bzw. phosphorsaurem Kalium zubereitet. Mit Rücksicht auf die bessere Beständigkeit kann mit Vorzug eine Standardlösung vom Monokaliumphosphat verwendet werden. Chemisch reines Monokaliumphosphat wird in Porzellanschalen fein verrieben und für einige Tage im Exsikkator über konzentrierter Schwefelsäure zwecks Entwässerung aufbewahrt. Von diesem trockenen Präparat werden 4,394 g abgewogen und in 1 Liter destillierten Wassers gelöst. 1 ccm dieser Lösung entspricht 1 mg Phosphor. Durch gravimetrische Kontrollbestimmung wird das Volumen der Standardlösung korrigiert. Von dieser Lösung werden 50 ccm abgemessen und je nach Bedarf auf 500 bis 2000 ccm verdünnt. Durch Zusatz von Chloroform wird die Standardlösung vor Pilzbefall geschützt; sobald aber die Lösung trübe erscheint, muß von neuem zubereitet werden.

Kolorimetrische Bestimmung. Das Verfahren beruht auf Bildung von Kiesel- und Phosphormolybdänsäure in saurer Lösung und auf ihrer Reduktion durch Hydrochinon, wobei die Molybdänsäure nicht reduziert wird. Durch weitere Einwirkung von Natriumsulfit in alkalischer Lösung wird die erhaltene grünliche Verfärbung in intensiv blaue verändert. Dieselbe Reaktion gibt auch die Arsensäure, welche aber in normalen Wasserextrakten des Bodens nicht vorkommt. Gegenwart von beträchtlicheren Mengen von Eisensalzen wirkt verzögernd auf die Bildung der blauen Verfärbung. Falls die angewendete Sulfitlösung eine größere Menge von Sulfaten enthält, verläuft die Farbreaktion nicht bis zu Ende und die Farbe zeigt einen Stich ins Grüne.

Von dem wässerigen Bodenextrakt werden 30 ccm abgemessen und in einem 100-ccm-Kolben mit 5 ccm der schwefelsauren Molybdänlösung und nachher mit 5 ccm der Hydrochinonlösung versetzt. Nach Ablauf von 5 Minuten werden 25 ccm der alkalischen Natriumsulfitlösung zugesetzt und mit zuvor ausgekochtem destillierten Wasser bis auf 100 ccm aufgefüllt. Nach weiteren 10 Minuten vergleicht man die erhaltene blaue Farbe der untersuchten Lösung mit einer in gleicher Weise behandelten Standardlösung im *Duboscq*schen Kolorimeter.

Die gewonnene blaue Verfärbung der *Phosphat*lösungen ist nicht absolut beständig. Trotzdem aber geben Messungen, welche innerhalb 1 Stunde ausgeführt werden, dieselben Resultate, wie nach Ablauf von 10 Minuten. Die durch Kieselsäure hervorgerufenen Verfärbungen sind weit beständiger als die der Phosphorsäure. Bei Serienuntersuchungen ist es ratsam, beide Gefäße des Kolorimeters mit den blaugefärbten Lösungen gleichzeitig zu füllen.

Bestimmung des Phosphorsäuregehalts nach Atkins (10).

Lösung A. Gemisch von 100 ccm 10%igem Ammoniummolybdat mit 300 ccm 50 vol.-%iger Schwefelsäure, im Dunkeln aufzubewahren.

Lösung B. Zinnchlorürlösung, zu jeder Bestimmung frisch bereitet durch Lösung von 0,1 g Zinn in 2 ccm chemisch reiner Salzsäure unter Zusatz von einem Tropfen 4%igen Kupfersulfats. Die Reaktion wird durch Erwärmen beschleunigt und das Gemisch auf 10 ccm mit Wasser verdünnt.

Lösung C. Standardlösung vom Monokaliumphosphat, entsprechend 0,05 mg P in 100 ccm Flüssigkeit.

Bei der Phosphorsäurebestimmung in wässerigen Bodenauszügen wurden 50 ccm des Extrakts mit 2 ccm der schwefelsauren Ammoniummolybdatlösung und 5 Tropfen der Zinnchlorürlösung versetzt und auf 100 ccm aufgefüllt. Nach 10 Minuten wird die blaue Verfärbung mit einer in derselben Weise behandelten Standardphosphatlösung im Kolorimeter verglichen. Die bei Ackerböden resultierende Verfärbung ist meistens sehr gering und kann in vielen Fällen vernachlässigt werden, ohne daß die Kieselsäurebestimmung dadurch beträchtlicher beeinflußt würde. Nur die sehr humusreichen Böden (oberste Schichten von Waldböden, Torfböden und animalisch gedüngte Böden) zeigten einen beträchtlicheren Phosphorsäuregehalt der Wasserauszüge.

Einfluß der Extraktionsdauer. Die Menge der in Lösung übergegangenen Kieselsäure hängt von der Dauer der Einwirkung ab. In folgenden Beispielen ist die Lösungsgeschwindigkeit nach bestimmten Zeitabschnitten bis 3 Stunden der Berührungszeit an drei typischen Bodenproben verfolgt worden. Die in der Zeit „0" angeführten Kieselsäuremengen sind in Wasserlösungen festgestellt worden, die nach dem Vermischen des Bodens mit Wasser sofort filtriert wurden. Bei diesen Versuchen wurde das übliche Verhältnis von Boden zu Wasser (30 g : 100 ccm) eingehalten, und sonst in der schon früher geschilderten Weise vorgegangen.

Extraktionszeit	Menge der gelösten Kieselsäure in mg SiO_2		
	Lehmboden		Tonig-lehmiger Sand
	Ackerkrume	Untergrund	Ackerkrume
0	16,53	8,65	5,47
0,5	20,10	15,26	6,74
1	22,64	17,30	6,36
2	25,68	22,89	8,90
3	25,95	27,56	8,90

Die Einstellung eines Gleichgewichtes erfolgt bei jedem Boden in verschiedenen Zeitabschnitten. Während der Filtration muß auch den verlaufenden Absorptionserscheinungen Rechnung getragen werden. Es wurde beobachtet, daß die letzten Anteile des Filtrates, welche durch höhere Bodenschichten am Filter durchlaufen, eine merkbare Erniedrigung des Kieselsäuregehalts aufweisen. Um diese Schwankungen möglichst zu vermeiden, wird empfohlen, bei der Filtration das Dekantationsverfahren anzuwenden. Weiter ist es notwendig, stets erst nach Durchlaufen von derselben Filtratmenge (60 bis 70 ccm) den aliquoten Teil des Wasserauszuges zur kolorimetrischen Analyse abzumessen.

Einfluß des Verhältnisses Boden zu Wasser auf die gelöste Kieselsäuremenge. Bei Extraktion eines Bodens mit Wasser haben wir es mit einer physikalischen bzw. chemischen Reaktion zu tun. Die Menge der zu einem gewissen Zeitpunkte im Wasser gelösten Kieselsäure hängt von der Einstellung des Gleichgewichtszustandes zwischen Boden und Wasser ab, wobei nicht nur die Menge des zur Extraktion eines bestimmten Bodenquantums verwendeten destillierten Wassers, sondern auch die neben Kieselsäure in Lösung geratenen Mengen anderer Salze, die spezifischen Adsorptionserscheinungen und andere wichtige Faktoren eine große Rolle spielen. Um den Einfluß der zur Extraktion einer bestimmten Bodenmenge verwendeten Wassermenge näher kennen zu lernen, wurden in mehreren, nach physikalischer und chemischer Beschaffenheit verschiedenen Bodenproben diejenigen Kieselsäuremengen bestimmt, welche bei Anwendung von steigendem Volumen des Extraktionswassers aus 1 kg Boden gelöst werden. Die Untersuchungsresultate sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Wassermenge des Bodens %	SiO_2 in mg aus 1 kg Boden				
	Toniger Lehm	Sandig-toniger Lehm	Lehm	Lehmiger Sandboden	Lehmiger Sandboden
50	—	—	—	2,41	—
55	—	5,50	—	—	1,82
66	—	—	4,32	2,82	1,88
100	—	—	6,37	—	2,32
150	—	—	7,81	—	—
166	9,21	11,19	—	4,31	3,08
200	—	—	8,99	—	—
250	13,83	—	—	—	—
300	—	—	12,29	—	—
332	17,57	15,09	—	5,49	4,14
400	—	—	14,64	—	—
416	18,89	—	—	—	—
500	19,32	17,46	17,80	—	5,71
563	20,70	—	—	—	—
666	22,61	18,58	21,26	8,50	7,40
832	22,87	—	—	—	8,68
1000	24,51	20,48	23,58	11,18	—
1166	25,47	—	—	—	—
1332	—	21,49	25,52	12,99	10,31
1666	—	—	25,19	—	—
2000	—	—	—	16,12	—

Aus den Versuchsergebnissen dieser Untersuchungen geht hervor, daß durch die Einwirkung von steigenden Wassermengen auf den Boden die Menge der ionisierten Kieselsäure erhöht wird. Somit ergibt sich, daß die durch obenbeschriebenes Verfahren bestimmte Kieselsäuremenge nicht den tatsächlichen Gehalt des wasserlöslichen Siliciums in natürlichen Bodenlösungen darstellt. Die Kieselsäuremengen, ausgedrückt

in Milligramm auf 1 kg Boden, beziehen sich auf den durch Wasserextraktion im Verhältnis 30 g Boden zu 100 ccm Wasser sich eingestellten Gleichgewichtszustand nach einstündiger Berührungszeit und sind wesentlich größer als diejenigen, welche aus gleicher Bodenmenge unter natürlichen Bedingungen der Bodenfeuchtigkeit in den Bodenpreßsaft übergehen.

Die mechanische Zusammensetzung der Böden und die Bildung löslicher Kieselsäure. In den nachstehenden Versuchen wurden die Beziehungen zwischen der Zusammensetzung mechanischer Bodenbestandteile und der Menge in wässerige Lösung übergegangener Kieselsäure verfolgt. Die mechanischen Analysen der Böden wurden nach der Methode von *Kopecký* mit Hilfe seines Schlämmapparates ausgeführt und die Ergebnisse je nach der Bodenklassifikation in drei Hauptgruppen eingeteilt: 1. Tonböden und lehmhaltige Tonböden, 2. Tonhaltige Lehmböden und Lehme; 3. Ton-lehmhaltige Sandböden und Sande. Die folgenden Übersichtstabellen bringen die Ergebnisse der erwähnten vergleichenden Untersuchungen.

Aus den S. 50 bis 52 angeführten Vergleichsuntersuchungen kann man allgemein *eine annähernde Beziehung zwischen der löslichen Kieselsäuremenge und der mechanischen Bodenzusammensetzung* entnehmen. Bei tonhaltigen Böden wird die Menge an ionisierter Kieselsäure mit dem sinkenden Gehalt des Bodens an Tonbestandteilen herabgesetzt. Schwere tonhaltige Böden zeigen nicht die optimale Fähigkeit zur Abspaltung löslicher Kieselsäure. Tonhaltige Lehmböden und Lehme mit einem Gehalt von 90 bis 80 % der abschlämmbaren Bodenbestandteile (Durchmesser der Korngröße unter 0,05 mm) entbinden die größte Menge

I. Tonböden und lehmhaltige Tonböden.

Mechanische Zusammensetzung des Bodens: Gehalt an Bodenbestandteilen von Korngröße						Kieselsäuregehalt mg in 1 kg Boden
I. und II. bis 0,05 mm	I. bis 0,01 mm	II. 0,01 bis 0,05 mm	III. und IV. 0,05 bis 2,0 mm	III. 0,05 bis 0,1 mm	IV. 0,1 bis 0,2 mm	
97,34	86,56	10,78	2,66	0,42	2,24	11,51
96,36	67,70	28,66	3,64	1,50	2,14	10,06
95,43	59,80	35,64	4,56	2,30	2,26	11,17
94,58	52,02	42,56	5,42	2,92	2,50	13,12
92,94	37,98	54,96	7,06	6,32	0,74	10,80
92,52	47,14	45,38	7,48	5,30	2,18	20,46
91,58	44,94	46,64	8,42	4,52	3,90	17,63
91,22	52,18	39,04	8,78	3,78	5,00	17,50
91,04	47,72	43,32	8,96	6,12	2,84	17,22

II. Tonhaltige Lehmböden und Lehme.

Mechanische Zusammensetzung des Bodens: Gehalt an Bodenbestandteilen von Korngröße						Kieselsäuregehalt mg in 1 kg Boden
I. und II. bis 0,05 mm	I. bis 0,01 mm	II. 0,01 bis 0,05 mm	III. und IV. 0,05 bis 2,0 mm	III. 0,05 bis 0,1 mm	IV. 0,1 bis 0,2 mm	
89,94	42,44	47,50	10,06	5,96	4,10	22,57
89,52	50,60	38,92	10,48	7,90	2,58	20,64
89,12	41,36	47,76	10,88	7,48	3,40	23,05
88,80	37,28	51,52	11,20	10,06	1,14	21,32
88,64	49,76	38,88	11,36	8,40	2,96	20,14
88,62	56,74	31,88	11,38	4,90	6,48	21,52
88.20	55,86	32,34	11,80	7,68	4,12	20,16
88,65	47,76	40,89	11,35	8,77	2,58	21,57
86,80	46,14	40,66	13,20	9,18	4,02	24,41
86,52	42,30	44,22	13,48	9,12	4,36	27,44
85,62	37,28	48,34	14,38	10,16	4,22	22,31
84,85	41,06	43,79	15,15	13,33	1,82	21,98
84,81	35,64	49,17	15,19	13,11	2,08	21,86
84.80	34,50	50,30	15,20	10,86	4,34	25,62
84,70	46,88	37,82	15,30	11,56	3,74	20,27
84,46	37,20	47,26	15,54	8,86	6,68	21,98
83,87	56,60	27,27	16,13	11,72	4,41	28,23
82,25	41,60	40,65	17,75	9,21	8,54	22,04
81,76	35,28	46,48	18,24	10,20	8,04	25,56
81,68	43,26	38,42	18,32	12,16	6,16	18,29
80,76	45,28	35,48	19,24	5,08	14,16	14,05

der Kieselsäure. Bei ton-lehmhaltigen Sandböden und lehmigen Sandböden wird im Durchschnitt die Menge der wasserlöslichen Kieselsäure proportionell zu dem steigenden Gehalt an Sandbestandteilen (Durchmesser der Korngröße 0,05 bis 2,0 mm) herabgesetzt. Diese Böden haben aus 1 kg lufttrockener Masse 2,77 bis 27,44 mg wasserlöslicher Kieselsäure gelöst. Aus diesen Untersuchungen ist weiter zu ersehen, daß *die fein abschlämmbaren Bodenbestandteile von einer Korngröße zwischen 0,01 bis 0,05 mm bei lehmhaltigen Böden die Hauptquelle der löslichen Kieselsäure vorstellen.* Die meisten Böden, welche 40 bis 50 % der Bodenkörner von 0,01 bis 0,05 mm Durchmesser enthalten, sind mit löslicher Kieselsäure in genügender Menge versorgt, mit Ausnahme der schweren Tonböden.

Einfluß des Kalkes auf den Kieselsäuregehalt des wässerigen Bodenauszuges. In einer anderen Reihe von Untersuchungen wurde der Einfluß einer Zugabe von kohlensaurem Kalk auf das Löslichwerden der Kieselsäure verfolgt. Die zur Analyse verwendete Bodenmenge wurde vor

III. Ton-lehmhaltige Sandböden und Sande.

Mechanische Zusammensetzung des Bodens: Gehalt an Bodenbestandteilen von Korngröße						Kieselsäuregehalt mg in 1 kg Boden
I. und II. bis 0,05 mm	I. bis 0,01 mm	II. 0,01 bis 0,05 mm	III. und IV. 0,05 bis 2,0 mm	III. 0,05 bis 0,1 mm	IV. 0,1 bis 0,2 mm	
78,99	40,38	38,61	21,01	16,39	4,62	18,82
77,83	37,34	40,49	22,17	12,88	9,29	16,25
69,20	41,86	27,34	30,80	5,68	25,12	13,88
64,71	45,43	19,28	35,29	25,34	9,95	15,67
64,34	42,80	21,54	35,66	10,46	25,20	9,44
63,52	44,60	18,92	38,48	10,06	26,42	8,97
61,50	36,76	24,74	38,50	6,98	31,52	9,66
56,10	38,04	18,06	43,90	7,46	36,44	9,10
54,62	35,10	19,52	45,38	6,42	38,96	7,46
52,26	36,70	15,56	47,74	6,16	41,58	6,51
52,24	32,56	19,68	47,76	8,18	39,58	9,26
51,96	37,22	14,74	48,04	13,78	34,26	9,08
49,68	33,84	15,84	50,32	8,98	41,34	10,12
49,54	29,84	19,70	50,46	7,08	43,38	7,46
47,88	31,08	16,80	52,12	7,46	44,66	7,11
44,58	23,70	20,88	55,42	11,16	44,26	7,27
44,18	29,44	14,74	55,82	6,38	49,44	7,19
42,06	22,20	19,86	57,94	6,28	51,66	4,38
41,24	25,46	15,78	58,76	12,24	46,52	6,26
40,80	26,82	13,98	59,20	17,82	41,38	9,65
36,40	22,64	13,76	63,60	20,35	43,25	8,02
29,54	17,36	12,18	70,64	7,40	63,06	2,77
21,18	16,62	9,56	73,82	7,08	66,74	3,56

der Extraktion mit steigenden Mengen Kalkcarbonat versetzt und in der üblichen Weise mit 100 ccm destilliertem Wasser ausgelaugt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

$CaCO_3$ zugesetzt		Tonhaltiger Lehmboden (Čáslav)	Humoser Lehmboden (Radboř)
g	% des Bodens		
0	0	12,08	20,36
0,3	1	12,34	18,57
0,75	2,5	12,21	19,46
1,50	5	12,08	19,20
2,25	7,5	11,70	19,34
3,0	10	13,35	18,57
4,5	15	12,21	18,06

Bei weiteren Versuchen wurden dieselben Böden in lufttrockenem Zustande mit steigenden Mengen von kohlensaurem Kalk vermischt, in geräumigen Erlenmeyerkolben je bis zur vollen Wasserkapazität mit destilliertem Wasser versetzt und 14 Tage stehengelassen. Die Menge der nach dieser Zeit festgestellten Kieselsäure in den Wasserextrakten ist aus folgender Tabelle ersichtlich:

$CaCO_3$ zugesetzt		Tonhaltiger Lehmboden (Čáslav)	Humoser Lehmboden (Radboř)
g	% des Bodens		
0	0	12,21	24,04
0,30	1	11,70	22,51
0,75	2,5	12,34	20,48
1,50	5	11,83	23,03
2,25	7,5	12,84	22,61
3,00	10	11,45	22,51
4,50	15	11,32	21,24
6,00	20	10,96	20,60

Aus den Untersuchungen ist ersichtlich, daß erst in der zweiten Versuchsreihe, nach 14tägiger Einwirkung der höchsten Kalkgaben auf den feuchten Boden eine wahrnehmbare Herabsetzung der in wässerige Lösung übergegangenen Kieselsäuremengen eingetreten ist.

Einfluß des Eintrocknens des Bodens auf die Löslichkeit der Kieselsäure. Durch verschiedene Untersuchungen ist gezeigt worden, daß die Wirkung der Bodennährstoffe und besonders der Phosphorsäure durch Austrocknen des Bodens an der Luft erheblich gesteigert werden kann. Es wurde angenommen, daß die Phosphorsäureverbindungen durch das Austrocknen des Bodens in eine leicht assimilierbare Form überführt werden. Es erscheint wahrscheinlich, daß an dieser erhöhten Wirkung der Bodenphosphorsäure auch die frei gewordene Kieselsäure unter Umständen beteiligt werden kann. Die Versuche von *Emmerling* und *Loges* (12) zeigen, daß bei verschiedenen Torfböden durch den Einfluß des teilweisen Eintrocknens nicht nur die Löslichkeit der Phosphorsäure, sondern auch der Kieselsäure besonders stark zugenommen hat, wodurch auf Grund der Untersuchungen von *Lemmermann* die Wirkung der Phosphorsäure verstärkt werden kann.

Während meiner Studien über das Vorkommen der Kieselsäure in natürlichen Böden habe ich Untersuchungen über den Einfluß des Eintrocknens von Böden auf den Kieselsäuregehalt einiger vorher mehrmals mit Wasser ausgelaugten Bodenproben durchgeführt:

300 g lufttrockenen Bodens wurden mit 1000 ccm destilliertem Wasser 2 Stunden ausgelaugt, filtriert und im Filtrat der Gehalt an löslicher Kieselsäure bestimmt. Die Extraktion wurde noch dreimal wiederholt. Nachher wurde die Bodenprobe an freier Luft voll ausgetrocknet und 30 g der lufttrockenen Substanz in einen geräumigen Erlenmeyerkolben überführt, mit 10 ccm destilliertem Wasser befeuchtet und bei Laboratoriumstemperatur stehengelassen. Nach Ablauf von 14 Tagen wurde der Boden mit 100 ccm Wasser ausgelaugt und im Extrakt die löslich gewordene Kieselsäuremenge festgestellt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in folgender Übersichtstabelle zusammengefaßt:

Boden	Kieselsäuremenge in mg SiO_2 in 1 kg lufttrockenen Boden: Vor der Extraktion	Nach der ersten Extraktion	Nach der zweiten Extraktion	Nach der dritten Extraktion	Nach 14täg. Aufbewahr. d. feuchten, 3mal ausgelaugten Bod.
Roudnice	31,34	27,78	21,37	17,09	29,23
Unhošt (Ackerkrume)	32,05	25,27	17,09	22,08	36,75
Unho t (Untergrund)	37,91	34,68	22,44	19,29	36,29
Zvoleněves	23,00	19,52	14,50	9,77	23,18
Klatovy (Wiesenboden)	21,99	14,54	10,38	4,14	19,45
Poděbrady	18,91	15,27	12,21	3,66	21,06
Hořice	23,99	15,88	11,70	9,31	25,53
Měšice	17,08	13,13	8,24	4,72	18,20
Valečov	15,09	12,18	6,40	5,34	13,50
Bystré	11,35	9,32	6,10	5,49	14,25

Die in der Tabelle angeführten Versuchsergebnisse zeigen das allmähliche Sinken des wasserlöslichen Kieselsäuregehalts bei wiederholten Bodenextraktionen. Aus den Untersuchungen ist weiter die interessante Erscheinung zu entnehmen, daß *in den durch mehrmalige Extraktion an lösliche Kieselsäure verarmten Böden nach Eintrocknen und 14tägigem Feuchthalten der Bodenproben durch nachheriges Auslaugen in allen Fällen die ursprüngliche lösliche Kieselsäuremenge wiedergefunden wurde.* Dadurch wird auch die Schlußfolgerung *Lemmermanns* bestätigt, daß durch den Einfluß des Bodeneintrocknens die neu löslich gewordene Kieselsäure das Assimilationsvermögen von Phosphorsäure zur wesentlichen Förderung führen kann.

Einfluß der wasserlöslichen Kieselsäure in Böden auf die Phosphorsäureassimilation durch die Pflanzen. Durch die Untersuchungen von *Lemmermann* und *Wiesmann* einerseits und *Hall* und *Morison* andererseits ist gezeigt worden, daß die ertragsteigernde Wirkung der Kieselsäure bei unzureichender Phosphorsäureernährung auf einer Steigerung der Phosphorsäureresorption beruht. Die genannten Forscher haben in ihren Abhandlungen über die Kieselsäurefrage mehrmals auf die mögliche Bedeutung der schon in natürlichen Böden vorhandenen löslichen Kieselsäureverbindungen für die Resorption der Phosphorsäure hingewiesen und angenommen, daß die Kieselsäureverbindungen des Bodens zum Teil in ähnlicher Weise wirken können, wie die zu den bisherigen Versuchen benutzte kolloidale Kieselsäure.

In der vorliegenden Arbeit habe ich versucht, die Beziehungen zwischen den wasserlöslichen Kieselsäureverbindungen des Bodens und der Intensität der Phosphorsäureresorption durch die Pflanzen zu verfolgen. Die Assimilation der Phosphorsäure von verschiedenen Böden wurde mit Hilfe der *Neubauer*schen Roggenkeimpflanzenmethode festgestellt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der folgenden Übersichtstabelle zusammengestellt:

Herkunft des Bodens	Gehalt an wasserlösl. Kieselsäure mg in 1 kg lufttrockenen Boden	Phosphorsäureaufnahme nach *Neubauer* mg in 100 g lufttrockenen Boden	Herkunft des Bodens	Gehalt an wasserlösl. Kieselsäure mg in 1 kg lufttrockenen Boden	Phosphorsäureaufnahme nach *Neubauer* mg in 100 g lufttrockenen Boden
Zderaz . . .	31,78	+ 9,60	Unhošt. . .	16,06	+ 2,17
Suchomasty	31,19	+ 9,14	Poděbrady .	15,65	+ 2,11
Roudnice . .	32,29	+ 8,05	Zvoleň . . .	18,39	+ 2,04
Štěpánov .	26,42	+ 7,82	Roudnice . .	14,40	+ 1,86
Poděbrady .	27,40	+ 7,58	Karlov . . .	14,76	+ 1,69
Cerhenice .	24,26	+ 7,28	Opava . . .	18,13	+ 1,51
Hořice . . .	22,70	+ 6,61	Zvoleněves .	10,90	+ 1,47
Čakovice . .	23,71	+ 6,12	Sabinov . .	11,62	+ 0,89
Světi . . .	26,49	+ 5,87	Čáslav . . .	10,21	+ 0,85
Vtelno . . .	20,71	+ 4,70	Klatovy . .	9,90	+ 0,60
Veselí . . .	21,05	+ 4,59	Řepiště . .	11,70	+ 0,43
Rosice . . .	19,88	+ 4,42	Zderaz . . .	10,70	+ 0,40
Chrudim . .	21,57	+ 4,34	Vladimírov .	8,98	— 0,13
Liblice . . .	17,20	+ 4,25	Měšice . . .	8,62	— 0,50
Libějovice .	13,85	+ 4,15	Smiřice . .	8,81	— 0,57
Ždár . . .	15,15	+ 4,11	Bystřice . .	8,60	— 0,92
Bilovice . .	16,95	+ 3,67	Valečov . .	7,02	— 1,47
Čáslav . . .	19,36	+ 3,43	Černilov . .	8,39	— 1,80
Hořice . . .	17,90	+ 3,39	Plzeň . . .	7,37	— 1,95
Chrudim . .	18,61	+ 3,26	Vel. Bakta .	6,34	— 2,97
Přitočno . .	14,17	+ 3,08	Barca . . .	7,58	— 3,06
Přestavlky .	18,20	+ 2,87			

Aus den angeführten Untersuchungen ist ersichtlich (s. auch Abb. 1), daß die höchsten Phosphorsäuremengen durch die wachsenden Roggenkeimpflanzen nur aus den Böden resorbiert wurden, welche den größten

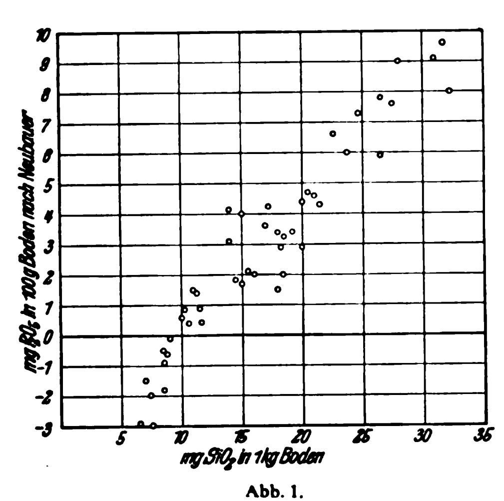


Abb. 1.
Menge assimilierter Phosphorsäure nach *Neubauer* und Gehalt an löslicher Kieselsäure in Böden.

Kieselsäuregehalt des wässerigen Bodenauszuges aufwiesen und umgekehrt, daß die kieselsäurearmen Böden die geringste bzw. negative Phosphorsäureaufnahme zeigten. Der *natürliche Kieselsäuregehalt des Bodens bewirkt danach eine beträchtliche Steigerung der Resorption von Bodenphosphorsäure, ähnlich wie dies durch künstliche Zugabe von löslichen Silikaten bzw. kolloidaler Kieselsäure von Lemmermann und anderen nachgewiesen wurde.*

Die löslichen Kieselsäureverbindungen der natürlichen Böden verdienen daher nähere Betrachtung bei der Lösung der Phosphorsäurebedürftigkeitsfragen. Soweit die Böden mit Phosphorsäureverbindungen genügend versorgt sind, kann die Bestimmung der wasserlöslichen Kieselsäure gewisse Hinweise auf die Resorptionsfähigkeit der Phosphorsäure für die Pflanzen liefern. Dies wurde auch durch vergleichende Kieselsäurebestimmungen in Böden mit Felddüngungsversuchen bestätigt, welche zeigten, daß *eine ertragsteigernde Wirkung von Phosphorsäuredüngung zu Zuckerrübe besonders in den Fällen gesichert wurde, wo der nach dem oben beschriebenen kolorimetrischen Verfahren festgestellte Kieselsäuregehalt des Bodens weniger als 20 mg SiO_2 in 1 kg betrug.* Über diese Untersuchungen wird eingehend an anderer Stelle berichtet werden.

Der wässerige Bodenextrakt enthält außer ionisierter Kieselsäure wahrscheinlich noch andere komplexe Kieselsäureverbindungen, wie Humuskieselsäure und andere. Inwieweit diese Verbindungen an der Steigerung der Phosphorsäureresorption teilnehmen, muß dahingestellt bleiben, da wir über das Vorkommen und Zusammensetzung und besonders über die Wirkung dieser Kieselsäurekomplexe in Böden sehr wenig unterrichtet sind.

Literatur.

1) *Wolff* und *Kreutzhage*, Landw. Versuchsstat. **30**, 161, 1884. — 2) *A. D. Hall* und *G. T. Morison*, Proc. of Roy. Soc. London 77, 455, 1906. — 3) *D. S. Jennings*, Soil Science **7**, 201, 1919. — 4) *O. Lemmermann* und *H. Wiesmann*, Zeitschr. f. Pflanzenernähr. u. Düng., Abt. A, **1**, 185, 1922. — 5) *Dieselben*, ebendaselbst, Abt. A, **4**, 265, 1925. — 6) *H. Wiesmann*, ebendaselbst, Abt. A, **4**, 73, 1925. — 7) *W. W. Butkewitsch*, Journ. f. Landw. Wissensch. (russisch) **2**, 327, 1925. — 8) *H. Neubauer* und *Schneider*, Zeitschr. f. Pflanzenernährung u. Düngung, Abt. A, **2**, 1, 1923. — 9) *Bell* und *Doisy*, Journ. of Biolog. Chem. **44**, 55, 1920. — 10) *W. R. G. Atkins*, Journ. of Agric. Science **14**, 192, 1924. — 11) *C. H. Fiske* und *Y. Subbarow*, Journ. of Biol. Chem. **66**, 375, 1925. — 12) *Emmerling* und *Loges*, Agrikulturchem. Untersuchungen, Festschrift der Versuchsstation Kiel, 1895, S. 283.

Darstellung von Isopropyljodid.

Von

A. Récsei (Brünn).

(Eingegangen am 28. August 1927.)

Es ist interessant, daß das Studium der Zinkalkyle eine ähnliche, aber viel längere Entwicklung aufweist, als das der Magnesiumalkyle.

Fleck[1] machte zum erstenmal den Versuch, die Magnesiumalkyle, MgR_2, für synthetische Zwecke zu verwenden, jedoch ohne Erfolg. Erst die Anwendung der Magnesium-alkyl-halogenide durch *Barbier*[2] und *Grignard*[3] führten zu den bekannten, glänzenden, synthetischen Erfolgen. Die von *Frankland* im Jahre 1849 entdeckten und viel verwendeten, sehr wichtigen Zinkalkyle kamen hauptsächlich wegen ihrer Leichtentzündlichkeit an der Luft, so gut wie ganz außer Gebrauch. Erst in den letzten Jahren kam *Blaise*[4] auf den Gedanken, statt der Zinkalkyle die *Zink-halogenalkyle*, RZnX, zu benutzen. Mit Hilfe der leicht zu handhabenden Alkylzinkjodide sind die sonst schwer zugänglichen, homologen Ketone nach der Gleichung

$$R.CO.Cl + R_1.Zn.J = R.CO.R_1 + ZnJCl$$

leicht darstellbar.

Infolgedessen kommt den Alkyl-jodiden eine weitere, wichtige Verwendungsmöglichkeit zu.

Für die Darstellung von *Isopropyljodid* aus *Glycerin* ist in der Literatur die einzige, alte und nicht ganz richtige Vorschrift von *Markownikoff*[5] angegeben.

Die Reaktion verläuft — wie bekannt — folgendermaßen:

$$\begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{matrix} \xrightarrow[-H_2O]{3HJ} \begin{matrix} CH_2J \\ | \\ CHJ \\ | \\ CH_2J \end{matrix} \xrightarrow[-J_2]{} \begin{matrix} CH_2 \\ \| \\ CH \\ | \\ CH_2J \end{matrix} \xrightarrow{2HJ} \begin{matrix} CH_3 \\ | \\ CHJ \\ | \\ CH_3 \end{matrix} + J_2,$$

[1] Ann. d. Chem. **276**, 134, 1893.
[2] C. r. **128**, 110, 1899.
[3] Ebendaselbst **132**, 588, 1901.
[4] Bull. Soc. chim. France (4) **9**, I bis XXVI, 1911.
[5] Ann. d. Chem. **138**, 364, 1866.

wobei das Allyljodid ein Zwischenprodukt bildet. Außerdem entsteht aus Allyljodid und Jodwasserstoff *Propylen.*

Statt des von *Markownikoff* angegebenen Mengenverhältnisses (40 g Glycerin, 60 g Jod und 5,5 g weißer Phosphor) wählt man wirtschaftlicher folgendes: 60 g Glycerin, 50 g Jod und 5 g roter Phosphor. An Stelle des von *Markownikoff* vorgeschriebenen weißen Phosphors wird zweckmäßiger der rote Phosphor verwendet. 60 g Glycerin verdünnt man mit 60 ccm Wasser, gießt in einen Fraktionierkolben, der mit einem Kühler und Tropftrichter versehen ist, setzt 5 g roten Phosphor und allmählich unter guter Abkühlung 10 g feinpulverisiertes Jod zu. Es wird dann am Ölbade erwärmt, wobei das Isopropyljodid zu destillieren beginnt. Die übrigen 40 g Jod gibt man, in Isopropyljodid gelöst, tropfenweise dazu. Man verwendet stets das überdestillierende Produkt. Nachdem das ganze Jod zugesetzt wurde, destilliert man ab, gießt das Destillat in den Kolben zurück und destilliert nochmals. Das zweite Destillat ist im Gegensatz zu *Markownikoffs* Angabe nicht farblos, sondern braun, und läßt sich auch durch öfters widerholte Destillation nicht farblos gewinnen. Es kann aber durch Natronlauge entfärbt werden, indem man eine verdünnte Lösung derselben tropfenweise, unter Umschütteln, zusetzt. Mit Natriumthiosulfat läßt es sich nicht entfärben. Das braune Produkt wird daher wahrscheinlich kein elementar ausgeschiedenes Jod, sondern eine Jodverbindung sein. Man wäscht zweimal mit Wasser, trocknet über Chlorcalcium und destilliert, Kp. 88 bis 89°. Das Destillat soll, um das darin enthaltene Allyljodid in Isopropyljodid zu überführen, 12 Stunden in Jodwasserstoffatmosphäre stehen. Das reine Isopropyljodid riecht nicht lauchartig, sondern angenehm ätherisch.

Zur Frage der Art der Stickstoffretention bei Fütterung von Ammoniaksalzen[1].

Von

E. Schliephake.

(Aus der Medizinischen Poliklinik zu Rostock.)

(Eingegangen am 24. August 1927.)

Die Frage, ob und wieweit der tierische Organismus befähigt ist, einfachste, vor allen Dingen anorganische Ammoniakverbindungen zum Aufbau von Eiweiß zu verwerten, spielt schon seit Jahrzehnten in der landwirtschaftlichen Literatur eine große Rolle. So ist insbesondere die Frage von Stickstoffretentionen bei Fütterung von Ammoniaksalzen Gegenstand zahlreicher Untersuchungen geworden.

Durch Fütterungsversuche von *Kellner*[2], *Völtz*[3] und *Pescheck*[4] ist es sichergestellt, daß hierbei erhebliche Stickstofferspamis eintritt. Hammel konnten auf diese Weise geradezu gemästet werden, jedoch gelang dies nur bei sehr hohem Kohlehydratgehalt der Nahrung, während mit Rauhfütterung allein diese Erscheinung nicht zu erzielen war. Auch Harnstoff wirkte, wie Untersuchungen aus jüngerer Zeit von *Honcamp* und *Schneller*[5] zeigten, eiweißsparend. Es konnte dabei wahrscheinlich gemacht werden, daß ein Teil des Milcheiweißes unter Zuhilfenahme des Stickstoffs von eingeführtem Harnstoff gebildet wurde, denn bei Kühen, die solche Harnstoffzulagen erhielten, wurde in der Milch mehr Eiweißstickstoff ausgeschieden als aus dem Grundfutter für die Milchbildung und Lebenserhaltung zusammen zur Verfügung stand. Bei den Wiederkäuern liegen nun insofern besondere Verhältnisse vor, als die Nahrung im Pansen besonders starker Bakterieneinwirkung unterliegt, so daß eine Übertragung der Befunde bei den landwirtschaftlichen Nutztieren auf Fleischfresser nicht ohne weiteres möglich war. Immerhin sprechen Versuche von *Knoop*[6]

---

[1] Die wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden von mir im Jahre 1924 auf der ersten Tagung der nordwestdeutschen Gesellschaft für innere Medizin in Rostock vorgetragen.

[2] *Kellner*, Landw. Vers. **72**, 439, 1900.

[3] *Völtz*, Pflüg. Arch. **112**, 425, 1906; **121**, 126, 1908.

[4] *Pescheck*, ebendaselbst **142**, 143, 1911 (Literatur).

[5] *Honcamp* und *Schneller*, diese Zeitschr. **138**, 463, 1923.

[6] *Knoop*, Zeitschr. f. phys. Chem. **67**, 489, 1910.

und *Embden*[1] dafür, daß gewisse Aminosäuren auch im Körper des Fleischfressers aus einfachen Verbindungen synthetisiert werden können. *Grafe*[2], *Abderhalden*[3] und ihre Mitarbeiter konnten tatsächlich auch bei Hunden und Schweinen erhebliche Stickstoffretentionen bei Fütterung von Ammoniaksalzen feststellen, vor allen Dingen dann, wenn im Überfluß Kohlehydrate gegeben wurden. Auf diese Weise konnte sogar Gewichtsansatz erzielt werden. *Taylor* und *Ringer*[4], sowie *Underhill* und *Goldschmidt*[5] bestätigten diese Untersuchungen und zeigten, daß auch im Hungerzustande mit Ammoniaksalzen Stickstoffretentionen erzielt werden können. Wie *Grafe*[6] nachwies, ist prinzipiell dasselbe sowohl für Ammoniaksalze wie für Harnstoff auch bei Menschen der Fall. In neuester Zeit haben dann *Terroine*, *Fleuret* und *Stricker*[7] in vollem Maße die Ergebnisse bestätigt, so daß an der Tatsache einer erheblichen Stickstoffretention bei Fütterung von Ammoniaksalzen auch bei Fleischfressern nicht mehr gezweifelt werden kann. Die entscheidende Frage ist nur, wie diese Stickstoffretentionen zu deuten sind bzw. in welcher Form der Stickstoff zurückgehalten wird. Es ergaben sich dafür im wesentlichen folgende Möglichkeiten: Der Stickstoff des gefütterten Ammoniaks wird zur Synthese von Eiweiß- oder eiweißartigen Verbindungen benützt, analog wie es *Knoop*[8] und *Embden*[9] schon für einzelne Aminosäuren nachgewiesen hatten. Zweitens könnte eine Ersparnis von Körpereiweiß dadurch stattfinden, daß dieses infolge der reichlichen Ammoniakzufuhr vor Zerfall bewahrt wird. Dieser Vorgang könnte nach *Terroine* und seinen Mitarbeitern[7] auch in der Weise vor sich gehen, daß das Eiweiß zum Teil als Ammoniakbildner zur Abstumpfung einer intermediären Acidose in Betracht kommt und in dieser Eigenschaft durch von außen zugeführte Ammoniaksalze bzw. Harnstoff teilweise oder ganz ersetzt werden könnte. Die Frage, ob die Stickstoffretentionen gleichzeitig mit einer Ersparnis von Eiweiß einhergehen, suchte *Gessler* (unter *Grafe*[10]) durch Verfolgung der S-Bilanz bei hungernden Tieren zu entscheiden. Eine Eiweißersparnis müßte sich dabei auch in einer verminderten S-Ausfuhr äußern. Letzteres war nicht der Fall. Die Versuche sind aber insofern nicht ganz eindeutig, als die Tiere kohlehydratarm ernährt wurden und die Kohlehydrate selbst schon, wie *Rosenberg*[11] zeigte, eine Schwefelersparnis bewirkten. Immerhin sprechen die Untersuchungen von *Gessler* dafür, daß die Cystingruppe aus dem Eiweiß eingeschmolzen wird. Auf der anderen Seite ist zu bedenken, daß gerade im Hunger die Neigung zur Acidose besonders stark ist. Als dritte Möglichkeit kommt in Betracht, daß beim Fleischfresser die Verhältnisse ähnlich lägen wie beim Pflanzenfresser, und daß auch hier die Darmbakterien insofern eine große Rolle spielen, als sie das zugeführte Ammoniak oder

---

[1] *Embden*, diese Zeitschr. **29**, **423**, 1910.
[2] *E. Grafe* und Mitarbeiter, Zeitschr. f. phys. Chem. **77** bis **90**.
[3] *Abderhalden* und Mitarbeiter, ebendaselbst **77** bis **84**.
[4] *Taylor* und *Ringer*, Journ. of biol. Chem. **14**, 407, 1913.
[5] *Underhill* und *Goldschmidt*, ebendaselbst **15**, 341, 1913.
[6] *E. Grafe*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **117**, 448, 1915.
[7] *E. F. Terroine*, *P. Fleuret* und *Th. Stricker*, Arch. internat. de phys. **22**, 43, 1923; *E. F. Terroine* und *Mahler-Mendler*, ebenda **28**, f. 2, S. 101, 1927.
[8] *Knoop*, l. c.
[9] *Embden*, l. c.
[10] *Gessler*, Zeitschr. f. phys. Chem. **109**, 280, 1920.
[11] *Rosenberg*, Inaug.-Diss. Heidelberg 1915.

den Harnstoff selbst zum Aufbau ihres Eiweißes benutzten und ihre zerfallenden Leiber dann direkt die Quelle des vermehrten Eiweißes würden: a priori ein sehr unwahrscheinlicher Vorgang, wenn man bedenkt, daß gerade bei Fütterung mit Ammoniaksalzen und Kohlehydraten die bakterielle Tätigkeit im Darme nicht sehr groß ist.

Eine vierte Möglichkeit wäre die, daß die Ammoniaksalze als solche oder in niederer Bindung, eventuell als Aminosäuren im Körper liegen blieben. Falls solche Verbindungen tatsächlich retiniert werden, müßten sie im Körper nachweisbar sein, zumal es sich ja um recht große Mengen bei längerer Versuchsdauer handeln müßte. Ein Abgang des Ammoniums in Gasform ist natürlich ausgeschlossen, da das Ammoniak leicht löslich ist und immer Verbindungen eingeht, vor allen Dingen aber der Stuhl bei Kohlehydratkost gewöhnlich sauer reagiert, so daß schon dadurch eine chemische Bindung des Ammoniums eintreten müßte.

Die Aufgabe meiner Untersuchungen war vor allen Dingen, der vierten Möglichkeit näherzutreten und sie auf ihre Richtigkeit zu prüfen. Das nächstliegende Organ, das von den vom Darm aufgesogenen Salzen auf jeden Fall durchströmt werden muß, ist die Leber. Es wurde zunächst untersucht, ob sich in den Lebern von stickstoffarm genährten Tieren und solchen, die mit der gleichen Nahrung Ammoniaksalze erhielten, Unterschiede im Gesamtstickstoff, im Reststickstoff, im Aminostickstoff und Ammoniakstickstoff fanden. Zu den Versuchen wurden Meerschweinchen gewählt, bei denen sich, wie aus Tabelle I hervorgeht, große N-Rententionen bei Ammoniakfütterung erzielen lassen. Ein Nachteil ist, daß einmal die Tiere, wenn sie in engen Stoffwechselkäfigen gehalten werden, an Gewicht verlieren und zweitens kein Wasser saufen, da sie ihren Wasserbestand nur durch Fressen

Tabelle I.

Vorperiode.

Datum 1922	Gewicht	N-Zufuhr g	Harnmenge	Harn-N nach *Kjeldahl*
6. VI.	562	0,182 in 30 g Kartoffel + 20 g Kohlrübe + 5 g Gras täglich	32	0,28
7. VI.	550		46	0,36
8. VI.	38		34	0,31
9. VI.	30		20	0,174
10. VI.	25		46	0,328
11. VI.	35		48	0,493
12. VI.	25		34	0,160
13. VI.	12		28	0,312
14. VI.	05		32	0,432
15. VI.	497		25	0,393

Bilanz der Vorperiode: Einfuhr 1,82 g, Ausfuhr: 3,218 g N im Harn
+ 0,15 g Kot-N
= 3,368 g Gesamtausfuhr
— 1,82 g Gesamt-N-Einfuhr
= 1,55 g N-Verlust in der Vorperiode

Tabelle I (Fortsetzung).

Hauptperiode.

Datum 1922	Gewicht	Gesamt-N-Zufuhr g	Davon anorganisch in NH_4Cl	Harnmenge	Harn-N nach *Kjeldahl*
		I. Teil.			
16. VI.	507	0,312	0,122	26	0,238
17. VI.	05	0,312	0,122	30	0,225
18. VI.	490	Kartoffel 20 g, Gras 20, Brot 10	0,122	38	0,293
19. VI.	92		0,122	39	0,350
20. VI.	95	0,312	0,122	27	0,225
21. VI.	95	0,312	0,122	17	0,204
22. VI.	95	0,312	0,122	20	0,229
23. VI.	500	0,312	0,122	24	0,205
24. VI.	500	0,312	0,122	22	0,224
25. VI.	487	0,312	0,122	32	0,220
26. VI.	70	0,312	0,122	24	0,213
27. VI.	82	0,312	0,122	18	0,200
28. VI.	90	0,312	0,122	19	0,175
29. VI.	90	0,312	0,122	30	0,278
30. VI.	92	0,312	0,122	30	0,347
1. VII.	93	0,312	0,122	24	0,261
2. VII.	85	Sa. **5,304**	0,122	26	0,290
3. VII.	70	Semmel 5 g, Gras 20, Brot 10	0,122	25	0,227
4. VII.	50		0,122	23	0,146
		II. Teil.			
5. VII.	50	= **0,286**	0,122	24	0,232
6. VII.	77	Brot 20 g, Gras 25	0,122	40	0,284
7. VII.	87	0,363	0,122	40	0,255
8. VII.	90		0,122	42	0,362
9. VII.	502		0,122	22	0,182
10. VII.	505	0,363	0,122	32	0,379
11. VII.	514	0,363	0,122	21	0,203
12. VII.	520	0,363	0,122	19	0,182
13. VII.	525	0,363	0,122	48	0,457
14. VII.	515	0,363	0,122	26	0,304
15. VII.	523	0,363	0,122	19	0,252
16. VII.	520	0,363	0,122	20	0,256
17. VII.	520	0,363	0,122	27	0,340
18. VII.	526	0,363	0,122	19	0,262
19. VII.	530	0,363	0,122	19	0,176
20. VII.	520	0,363	0,122	19	0,179
21. VII.	515	0,363	0,122	15	0,321
22. VII.	515	0,363	0,122	18	0,255

Bilanz der Hauptperiode: 13,06, davon anorgan. 4,5, Harn-N = 9,07
Kot-N = 1,50

N-Abgabe = 10,57

N-Zufuhr = 13,06 g
— N-Abgabe = 10,57 g

= N-Ansatz + 2,49 g

wasserreicher Pflanzen zu ergänzen pflegen. Es mußte demnach eine Ernährungsweise gefunden werden, bei der genügend Wasser und Kohlehydrate bei möglichst geringem organischen Stickstoffgehalt zugeführt werden, um gute Vergleichswerte zu erhalten. Am besten bewährte sich eine Ernährung mit Kohlrüben und daneben Kartoffeln, die zur Erzielung eines höheren Kalorienwertes mit Fett oder Zucker vermischt wurden. Bei längerer Einförmigkeit der Nahrung ließ die Freßlust oft nach; die Nahrungsmittel mußten dann etwas variiert werden. Der Stickstoff wurde in Form von Ammoniumcitrat oder Ammoniumchlorid in 20%iger Lösung mit etwas HCl zugesetzt. Am Schlusse des Versuches wurde stets festgestellt, ob der Stickstoffgehalt des Nahrungsgemisches derselbe geblieben war. Die abgewogene Menge Kartoffeln wurde in der entsprechenden Lösung bzw. etwas Wasser gekocht und dann zerstampft, wobei die Flüssigkeitsmenge so gewählt wurde, daß sie ganz in dem Kartoffelbrei aufgesogen wurde. Der Brei wurde den Tieren in einem blechernen Freßnapf gegeben, der so von außen am Käfig befestigt war, daß das Tier zwar fressen, aber nicht in den Napf treten konnte. Bei den Tieren 1 und 3 war statt der Kartoffeln Brot gegeben worden, in das die Ammoniaksalze eingebacken waren. Selbstverständlich wurde in jedem Falle die tatsächlich dem Organismus eingeführte Menge in der Nahrung direkt bestimmt. Da, wo ein Vorrat des Gemisches hergestellt wurde, überzeugte ich mich stets von der Konstanz des Stickstoffgehaltes. Die Tiere selbst wurden in runden Käfigen gehalten, ein Drahtnetz ließ den Harn nach unten abfließen, wo er in 30%iger Salzsäure aufgefangen wurde, während der Kot auf dem Netz liegen blieb und jeden Tag gesammelt und unter Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure getrocknet wurde. Um N-Verluste möglichst zu vermeiden, wurde der Käfig täglich mit verdünnter Säure gespült. Die N-Bestimmung im Harn und Kot geschah nach der Methode von *Kjeldahl*. Zunächst wurden einige Versuche mit fortlaufenden täglichen Harn- und N-Bilanzuntersuchungen gemacht, um zu sehen, ob und in welchem Umfang bei Meerschweinchen, bei denen bisher derartige Versuche noch nicht angestellt waren, positive N-Bilanzen mit Ammoniaksalzen zu erzielen waren. Tabelle I bringt einen derartigen Versuch mit täglicher Bilanz. Es errechnete sich in diesem Falle eine Stickstoffretention in der 37tägigen Hauptperiode von + 2,5 g. Der Kot ist in diesem Falle nicht täglich, sondern nur periodenweise analysiert worden, wobei streng darauf geachtet wurde, daß die täglichen Kotmengen jedesmal angesäuert aufgehoben wurden, bis die Gesamtmenge zum Eindampfen kam. Beim Trocknen des Kotes gehen immer gewisse kleine Stickstoffmengen verloren; nach *Honcamp* (l. c.), der darüber besondere Untersuchungen anstellte, betragen diese Verluste aber im allgemeinen höchstens 1%. In den folgenden Versuchsreihen

N-Bilanz: Vorperiode.

Nr.	Dauer Tage	Gewicht g	N-Zufuhr	N-Ausfuhr Harn	Kot	Sa.	Bilanz
1	10	650—565	1,5	1,7	0,15	1,85	— 0,35
2	9	306—263	1,7	1,2	0,4	1,6	— 0,1
3	6	363—312	1,5	1,5	0,3	1,8	— 0,3
4	3	345—332	0,6	0,5	0,1	0,6	0
5	3	480—407	0,6	0,7	0,1	0,8	— 0,2
6	4	505—475	0,7	0,9	0,1	1,0	— 0,3
7	5	455—405	0,9	1,1	0,2	1,3	— 0,4
8	5	331—304	0,9	1,3	0,2	1,5	— 0,6
9	6	498—442	1,1	1,6	0,1	1,7	— 0,6
10	6	530—440	1,1	1,6	0,1	1,7	— 0,6
	Kontrolltiere I (gleiche Ernährung ohne NH_3-Zulagen)						
11	35	535—408	5,3	5,9	2,2	8,1	— 2,8
12	8	420—320	2,0	3,3	0,6	3,9	— 1,9
13, 17, 18, 19, 20	Kontrolltiere II, mit gewöhnlichem Stallfutter ernährt						

Tab[elle]

N-Bil[anz]

Dauer Tage	Gewicht g	or[g]
25	565—495	3,8
20	263—221	4,6
20	312—254	6,7
11	332—300	1,6
11	407—325	1,6
11	475—375	1,6
12	405—350	2,3
12	304—289	2,3
9	442—403	1,7
9	440—405	1,7

wurde von den täglichen N-Bestimmungen im Harn abgesehen und der Harn wie der Kot hinsichtlich des Gesamt-N-Gehaltes in Perioden bestimmt. Die Einzelversuche zerfielen, wie aus Tabelle I hervorgeht, in eine kurze Vorperiode, in der kohlehydratreiches Futter mit einem N-Gehalt, der unter der Abnutzungsquote lag, gegeben wurde. In der Hauptperiode wurden dann bei den einen Tieren Ammoniaksalzzulagen in der genannten Art vorgenommen, während die Kontrolltiere wie in der Vorperiode weiter gefüttert wurden. Im ganzen wurden an 10 Tieren Versuche in der geschilderten Art mit Ammoniakzulagen vorgenommen, zwei Tiere ohne Ammoniakzulagen ernährt, vier weitere mit Stallfutter. Die Tiere wurden dann am Schluß der Versuchszeit getötet und entblutet, der Darminhalt ausgespült und nach Ansäuern dem übrigen Kot beigemischt. Die Leber wurde nach Entbluten sofort herausgenommen und frisch gewogen. Ein kleiner Teil wurde gleich zur Stickstoffbestimmung nach *Kjeldahl* verascht, der größere Teil zerkleinert, in leicht mit Essigsäure angesäuertem Wasser gekocht, filtriert, das Filtrat mit Uranacetatlösung versetzt und auf 200 ccm aufgefüllt. Nach vollständiger Fällung wurde dann der Niederschlag abfiltriert und für die weiteren Bestimmungen benutzt. Zur Be-

II.

Hauptperiode						N-Fraktionen in der Leber.				
Zufuhr		N-Ausfuhr			Bilanz	Frischgewicht	Gesamt-N %	Rest-N	In % von Gesamt-N	
anorg.	Sa.	Harn	Kot	Sa.					Amino-N	Ammoniak-N
4,5	8,3	6,8	1,5	8,3	0	15,5	3,5	4,6	0,3	0,05
2,44	7,01	3,8	2,5	6,3	+ 0,7	7,0	3,5	4,3	0,3	0,04
2,44	9,14	4,3	3,9	8,2	+ 0,94	9,5	3,9	4,0	0,5	0,05
1,34	2,94	1,6	0,9	2,5	+ 0,44	10,4	3,2	4,4	0,5	0,01
1,34	2,94	1,7	0,9	2,6	+ 0,34	10,9	3,6	5,2	0,2	0,03
1,34	2,94	2,1	0,8	2,9	+ 0,04	9,4	3,9	5,1	0,3	0,03
1,46	3,76	2,4	0,7	3,1	+ 0,66	10,2	3,9	5,6	0,2	0,04
1,46	3,76	2,7	0,6	3,3	+ 0,46	7,5	3,8	3,8	0,2	0,02
1,1	2,8	1,4	0,5	1,9	+ 0,9	10,1	3,5	3,9	0,2	0,02
1,1	2,8	1,8	0,9	2,7	+ 0,1	19,0	3,1	4,2	0,3	0,03
Durchschnittswerte Hauptversuche:						—	3,59	4,81	0,3	0,03
						13,0	3,3	5,6	0,3	0,05
						10,5	3,6	5,9	0,1	0,02
Durchschnittswerte Kontrolltiere I:						—	3,45	5,75	0,2	0,035
						9,1	4,0	4,3	0,2	0,02
						7,6	4,1	5,1	0,2	0,02
						9,1	4,0	4,3	0,2	0,02
						9,0	3,2	7,0	0,1	0,02
						10,5	3,6	5,9	0,1	0,02
Durchschnittswerte Kontrolltiere II:						—	3,79	5,26	0,16	0,02

stimmung des Reststickstoffs wurden 20 ccm des Filtrats mit 3 ccm Schwefelsäure versetzt und dann Ammoniak nach der von *Abderhalden* angegebenen Mikro-Kjeldahl-Methode in n/100 Schwefelsäure übergetrieben und dann darin titrimetrisch bestimmt. Für die Ammoniakbestimmungen wurden 50 ccm des Filtrats genommen, in dem das nach Folin ausgetriebene Ammoniak gegen n/100 HCl titriert wurde. Amino-N wurde mit der *Sörensen*schen Formoltitration bestimmt, wobei allerdings bei den niederen, in Betracht kommenden Mengen die Titration mit n/5 Lösungen gewisse Ungenauigkeiten mit sich brachte.

Die wichtigsten Ergebnisse sind in Tabelle II niedergelegt. Aus ihr ist zunächst zu ersehen, daß in allen bis auf einen Fall positive Stickstoffbilanzen unter Berücksichtigung des Ammoniakstickstoffs erhalten wurden, so daß also auch beim Meerschweinchen die Dinge prinzipiell gleich liegen wie bei Hunden und Schweinen. Die in der Vorperiode negative Stickstoffbilanz wurde also stets in eine positive übergeführt. Es geht dies selbstverständlich nur dann, wenn kleine Mengen von Eiweiß, die aber unterhalb des Minimums liegen, verfüttert werden. Bezüglich des Einflusses der Ammoniakernährung auf die Zusammensetzung der Stickstofffraktionen der Leber gegenüber

normalem Stallfutter und gleicher Ernährung ohne Ammoniakzulagen bringen die letzten fünf Stäbe der Tabelle die entscheidenden Angaben. Die Werte für den Gesamtstickstoff zeigen außerordentliche geringe Schwankungen, 3,45 % bei eiweißarmem Futter ohne Ammoniakzulagen gegenüber 3,59 % bei Ammoniakzulagen und 3,79 % bei gewöhnlichem Stallfutter. Der Rest-N wird durch die Ammoniakzulagen nicht erhöht, sondern eher etwas erniedrigt (4,81 % des Gesamt-N gegenüber 4,75 beim Grundfutter ohne Zulage und 5,26 % bei Stallfutter). Die Unterschiede in der Aminofraktion zwischen den einzelnen Versuchsarten sind gleichfalls, zumal in Anbetracht der wenigen Untersuchungen, beim Grundfutter allein und beim Stallfutter, so gering, daß sie vernachlässigt werden können; das gleiche gilt für den Ammoniakstickstoff.

Aus diesen Untersuchungen geht klar hervor, daß das verfütterte, im Organismus zum Ansatz gekommene Ammoniak nicht in Form des Reststickstoffs oder als Aminosäure oder gar als unverändertes Ammoniak zurückgeblieben ist. Demnach liegt die Annahme nahe, daß es eiweißsparend gewirkt hat, ohne aber das Körpereiweiß völlig ersetzen zu können.

Die bisherigen Untersuchungen haben sich lediglich auf die Leber erstreckt, die allerdings das für den ersten Angriffspunkt des Ammoniaks wichtigste Organ ist. Darüber hinaus besteht natürlich die Möglichkeit, daß die Zusammensetzung anderer Organe gegenüber der Norm doch gewisse Veränderungen erfahren hat. Die nächste Aufgabe wäre es also, Untersuchungen des Gesamttieres vorzunehmen. Sollte auch dann die Zusammensetzung unabhängig von der Ammoniakdarreichung die gleiche bleiben, so wäre dadurch wohl mit Sicherheit der Beweis erbracht, daß das Ammoniak tatsächlich eiweißsparend gewirkt hat.

Über das Vorkommen von Vitamin D im Gärungsessig.

Von

Alexander Janke und Hans Lacroix.

(Aus dem Institut für Technische Biochemie und Mikrobiologie an der Technischen Hochschule in Wien.)

(Eingegangen am 24. August 1927.)

1. Allgemeines über das Mikrobenvitamin D[1].

Im Jahre 1901 hatte *Wildiers* unter *Ides* Leitung an der Universität Löwen in Belgien eine Arbeit mit dem Ziele ausgeführt, den Widerspruch in den seinerzeitigen Versuchen *Liebigs* und *Pasteurs* betreffend das Hefewachstum in mineralischen Nährlösungen aufzuklären. *Ide* und *Wildiers* nahmen die Existenz eines akzessorischen Stoffes an, den sie *Bios*[2] nannten und der anscheinend mit dem später durch *Funk* als *Vitamin D* bzw. durch *Euler* als *Wachstumsaktivator* „D_m" bezeichneten identisch ist.

Dieser Mikroben-Wuchsstoff ist ungemein weit verbreitet und tritt zumeist mit dem wasserlöslichen, antineuritischen Vitamin B vergesellschaftet auf, von dem er jedoch getrennt werden kann, z. B. durch Zusatz des Gemisches zu einer Hefekultur, die aus diesem das Vitamin D herausnimmt, so daß das unveränderte Vitamin B zurückbleibt, das sich durch den Tierversuch nachweisen läßt.

Das Mikroben-Vitamin D soll durch Hefezellen in Nährlösungen, die aus sorgfältig gereinigten Stoffen bereitet sind, neu gebildet und gespeichert

---

[1] Betreffend die Literatur über Mikrobenvitamine vergleiche man *M. Knorr*, Die Entwicklung des Vitamingedankens in der Bakteriologie, I. Übersicht, Ergebn. d. Hyg., Bakteriol., Immunitätsforsch. u. exper. Therap. 7, 641 bis 706, 1925.

[2] Eine ausführliche Darstellung der Biosfrage findet sich außer bei *Knorr* auch bei *A. Kossowicz*, Einführung in die Mykologie der Genußmittel und in die Gärungsphysiologie, Berlin 1911, sowie bei *H. Naumann*, Zeitschr. f. techn. Biol. 7, 1 bis 67, 1919.

werden (*MacDonald*[1], *Funk* und *Friedmann*[2]), ebenso auch durch verschiedene Bakterienarten (*Robertson*[3]).

Der Nachweis des Mikrobenvitamins D läßt sich durch die oft hierzu verwendete Beschleunigung der Hefegärung nicht eindeutig führen, da auch andere Substanzen (Gärungsaktivatoren usw.) in der gleichen Weise wirken. Nur die beobachtete Begünstigung der Sproßung kann als Beweis für das Vorhandensein von Mikrobenwuchsstoffen gelten, sofern hierbei eine Nähr- oder Reizwirkung der zugesetzten Substanzen ausgeschlossen erscheint.

Die Feststellung der Gegenwart des Mikrobenvitamins D läuft demnach auf die Bestimmung der *Generationsdauer* von Sproßpilzen hinaus, zu deren Berechnung man die Kenntnis der Anzahl von Individuen, die innerhalb einer gewissen Zeit aus einer einzigen Zelle hervorgegangen sind, benötigt. Diese Zahl läßt sich nach zwei verschiedenen Methoden ermitteln. Die eine besteht darin, eine bestimmte Zahl von Hefezellen, zumeist 200 pro Kubikzentimeter, in eine geeignete Mineralnährlösung einzusäen und nach Ablauf von 24 bis 72 Stunden die vorhandenen Individuen mittels einer Zählkammer auszuzählen. Die andere Methode bedient sich des *Lindner*schen Tröpfchenverfahrens, das die aus einer einzigen Zelle hervorgegangenen Individuen unmittelbar mikroskopisch auszuzählen gestattet. Dieses letztere Verfahren ist insofern empfindlicher, als die einzelne Hefezelle in reinen mineralischen Nährlösungen nur äußerst selten aussproßt, während bei der großen Aussaat der ersten Methode durch den austretenden Zellinhalt eventuell anwesender abgestorbener Zellen eine beachtenswerte Sproßtätigkeit einsetzen kann, wodurch der Unterschied zwischen Probe und Kontrolle weniger klar in Erscheinung tritt.

Die Generationsdauer errechnet sich in beiden Fällen nach folgender Formel

$$x = \frac{t \log 2}{\log E - \log A},$$

worin A die Zahl der ausgesäten, E die Zahl der geernteten Zellen und t die Versuchsdauer bedeuten.

2. Versuche mit Gärungsessig und Essigessenz.

Im Laufe von Untersuchungen betreffend die analytische Kennzeichnung des Gärungs-Spritessigs durch die Jodzahl, worüber an anderem Orte berichtet wurde[4], ergab sich die merkwürdige Tatsache,

[1] Journ. of biol. chem. **56**, 489, 1923.
[2] Ebendaselbst **56**, 851, 1923.
[3] Journ. of infect. dis. **34**, 395; **35**, 311, 1924.
[4] *A. Janke* und *F. Popberger*, Die deutsche Essigindustrie **31**, 257, 265, 1927.



daß ein Teil der jodbindenden bzw. durch Jod oxydierbaren Substanzen aus essigsaurer Lösung an Pflanzenkohle adsorbierbar und bei alkalischer Reaktion durch Lösungsmittel, wie z. B. Amylalkohol, ausschüttelbar ist, was die Vermutung nahelegte, daß es sich um Mikrobenwuchsstoffe von der Art des Vitamins D handle. Zum Nachweis der Wirkung der letzteren wurde in nachstehender Weise verfahren.

a) Anreicherung der fraglichen Stoffe.

Als Ausgangsmaterial dienten drei verschiedene Proben von reinem Gärungsessig (I, II, III) sowie eine Probe von Essigessenz.

Je 3 Liter der Gärungsessigproben wurden auf etwa 15 ccm, also auf $^1/_{200}$ des Ausgangsvolumens eingedampft, und zwar zwecks Vermeidung höherer Temperaturen und möglichster Entfernung der Essigsäure durch Wasserdampfdestillation im Vakuum. Wir erhielten so aus den drei Gärungsessigen die stark getrübten Konzentrate G^{I}, G^{II} und G^{III}.

Nachdem es sich gezeigt hatte, daß die in den so gewonnenen Konzentraten suspendierten Teilchen auf die Hefesprossung anscheinend ungünstig einwirken, wurden diese Trübungsstoffe durch Zentrifugieren entfernt; so ließ sich aus G^{III} das klare Konzentrat G_Z^{III} erhalten.

Um festzustellen, ob die fraglichen Stoffe adsorbierbar seien, wurden die Essige I und III durch 2½ Stunden mit Fullererde ausgeschüttelt, die letztere durch Zentrifugieren von der Flüssigkeit abgetrennt und hernach mit 10 ccm 1%igen Ammoniaks eluiert, nachdem sich das sonst übliche Barytwasser hierzu als nicht geeignet erwiesen hatte. Die so gewonnenen Eluate F^{I} und F^{III} dienten dann zum Anstellen der Versuche. Dem Ausschütteln mit Fullererde wurde auch das Konzentrat G^{III} (10 ccm) unterworfen, aus dem sich durch Elution des erhaltenen Zentrifugats mit 10 ccm 1%igen Ammoniaks das Eluat F_K^{III} gewinnen ließ.

Um die Widerstandsfähigkeit der fraglichen Substanzen Temperatureinflüssen gegenüber zu ermitteln, wurde das zentrifugierte Konzentrat des Essigs III durch 2 Stunden hindurch im Autoklaven bei 2 Atmosphären erhitzt; die so behandelte Probe sei als G_Z^{III} st. (= sterilisiert) bezeichnet.

Da immerhin die Möglichkeit bestand, daß die im Gärungsessig enthaltenen, aus den Nährsalzen der Essigmaischen stammenden Mineralstoffe einen günstigen Einfluß auf die Sproßtätigkeit der Hefe ausüben und so eine Vitaminwirkung vortäuschen, dampften wir 10 ccm zentrifugiertes Konzentrat des Essigs III bis zur Trockne ein, veraschten den Rückstand, laugten die Asche (0,0665 g) mit Wasser aus und brachten mit diesem wieder auf 10 ccm (A_K^{III}). Auch das Eluat,

das wir aus dem Fullererdeadsorbat von G^{III} erhalten hatten, wurde in der gleichen Weise behandelt und die Asche (0,004 g) wieder in 10 ccm Wasser gelöst (A_E^{III}).

Auch das Konzentrat G_Z^{III} selbst wurde daraufhin geprüft, ob es nicht *allein*, also ohne Mineralstoffzusatz, eine Hefevermehrung ermöglicht, und zwar kam es in 1%iger wässeriger Lösung zur Anwendung (Versuch 9, s. S. 72).

Für Vergleichszwecke konzentrierten wir auch 80%ige Essigsäure in der gleichen Weise wie die Gärungsessige durch Vakuum-Wasserdampfdestillation, und zwar 250 g Essigessenz, entsprechend 2 Liter 10%igen Essenzessigs auf 10 ccm, also wieder auf das 200fache; das erhaltene Konzentrat sei mit E bezeichnet.

b) *Versuchshefe und Mineralnährlösung.*

Um die Zählarbeit zu erleichtern bzw. die Aussaat einer bestimmten Zellenzahl überhaupt zu ermöglichen, ist es nötig, eine Heferasse mit lockeren, leicht zerfallenden Sproßverbänden zu verwenden; als solche hat sich die Bierhefe *Pankow* der Institutssammlung erwiesen.

Als Mineralnährlösung kam jene von *Hägglund*[1] zur Anwendung, jedoch in der Abänderung nach *Lacroix*, die in einer Verminderung des Gehalts an Ammoniumtartrat von 5 auf 2 g im Liter besteht. Zu der Nährlösung, die also folgende Zusammensetzung aufwies

Saccharose	50 g
Ammoniumtartrat	2 g
K_2HPO_4	5 g
$(NH_4)_2SO_4$	2 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g
H_2O	1000 ccm

kam noch ein Zusatz eines Gemisches primärer und sekundärer Phosphate, entsprechend dem $p_H = 5{,}3$, um die Pufferwirkung zu erhöhen.

Die gleiche Nährlösung wurde auch für die Heranzucht der Versuchshefe benutzt, jedoch nach Zusatz von einigen Tropfen zwölfgrädiger Malzwürze, um eine größere Sproßfreudigkeit zu erzielen.

Die erhaltene Ernte wurde durch Zentrifugieren abgeschieden und nach erfolgtem Waschen in die Mineralnährlösung eingebracht.

Nimmt man die Vorkultur in reiner Minerallösung vor, dann geht das Wachstum natürlich wesentlich langsamer vor sich; die so entstandenen „Hungerzellen“ werden in vitaminfreier Nährlösung wohl weniger leicht aussprossen als die unter Würzezusatz herangezogenen und so einen schärferen Vitaminnachweis erhoffen lassen. Dies trifft jedoch insofern nicht zu, als die schlecht ernährten Zellen leicht ab-

[1] Hefe und Gärung in ihrer Abhängigkeit von Wasserstoff- und Hydroxylionen. Bd. 21 von Sammlung chem. und chem.-techn. Vorträge, herausg. v. Herz, Stuttgart 1914.

sterben und dann einerseits ihre Leichen auch in der mit Wuchsstoffen versetzten Minerallösung keine Sprossung zeigen, andererseits aber durch Zerfall der Zelleiber das von der Hefe gebildete und gespeicherte Vitamin D, bzw. die Produkte der Autolyse in die Lösung gelangen und so auch in der Kontrollprobe ein Aussprossen der noch am Leben gebliebenen Zellen ermöglichen; beide Umstände bewirken demnach eine Angleichung der Verhältnisse zwischen Probe und Kontrolle, weshalb die Verwendung von „Hungerzellen" bei vielzelligen Aussaaten keine Vorteile bietet.

Die von uns geübte Verwendung gut ernährter, vitaminreicher Kulturen der Versuchshefe bedingt es, daß bei vielzelligen Aussaaten der letzteren auch in der *reinen* Minerallösung Sprossung eintritt und demnach die Gegenwart von Vitamin D in der Probe nur an der *rascheren* Sprossung, also der Abnahme der Generationsdauer zu erkennen ist. Bei einzelligen Aussaaten hingegen sproßt auch die gut ernährte Zelle in reiner Minerallösung zumeist nicht aus, nur bei der einen oder anderen Zelle wird es zur Anlage *eines* Sprosses kommen können. Mit dieser Methode ist demnach der Vitaminnachweis eindeutiger zu führen.

c) Versuche unter Verwendung einer gezählten Hefeaussaat.

Zu 100 ccm obiger Nährlösung wurden je ½, 1 bzw. 5 ccm der auf Wuchsstoffe zu untersuchenden Probe zugesetzt und hierauf pro Kubikzentimeter Nährlösung 200 Zellen der Hefe *Pankow* eingeimpft.

Da die Konzentrate infolge ihrer stark sauren Reaktion das p_H der Nährlösung etwas verschoben (auf $p_H = 5,1$), so wurde die jeweilige Kontrollprobe durch Hinzufügung von Essigsäure auf den gleichen p_H-Wert gebracht. Die Auszählung der Hefenernte erfolgte nach 48 Stunden.

Versuch Nr.	Zu prüfende Probe		Generationsdauer der Hefe in Stunden	
	Art	Menge pro 100 ccm ccm	mit Probezusatz	Kontrolle
I	Konzentrat G^{I}	0,5	5,7	10,4
		1	5,6	
		5	5,5	
II	Konzentrat G^{II}	0,5	5,8	10,5
		1	5,4	
		5	5,6	
III	Eluat F_K^{I}	0,5	7,6	10,8
		1	7,5	
		5	7,4	
IV	Eluat F_K^{III}	0,5	7,8	10,7
		1	7,8	
		5	7,8	

Die kleinen Unterschiede in der Generationsdauer bei verschieden starker Dosierung liegen innerhalb der Versuchfehler. Es zeigt sich demnach bei dieser Methodik bereits bei ½ ccm Zusatz die maximale Begünstigung der Sproßtätigkeit. Diese wäre vielleicht bei noch geringeren Zusätzen aufgetreten, wenn wir solche verwendet hätten.

d) Versuche mit Einzell-Aussaaten.

Wie bereits oben angegeben worden ist, kam für diese Zwecke das *Lindner*sche Tröpfchenverfahren zur Anwendung, und zwar wurde die auf Wuchsstoffe zu untersuchende Probe (Konzentrat oder Eluat) in der entsprechenden Menge der in einem Schüttelfläschchen befindlichen Mineralnährlösung zugesetzt und das Gemisch nach guter Verteilung zur Herstellung der Einzellkulturen verwendet. Bei der Auswertung der Versuchsergebnisse wurde derart vorgegangen, daß alle Einzellaussaaten der verschiedenen gleichartigen Versuche (d. h. mehrmaliger Wiederholungen) zusammengezogen wurden und der gleiche Vorgang auch bei den Ernteergebnissen stattfand, so daß die angegebenen Werte für die Generationsdauer Durchschnittswerte sind, was ihnen einen höheren Grad von Zuverlässigkeit verleiht. Ergab sich für die Generationsdauer ein Wert von über 100 Stunden, so wurde unter Hinweis auf diesen Umstand von einer Anführung der errechneten Zahl Abstand genommen, da sonst irrige Vorstellungen über den Grad der Genauigkeit der Generationsdauerbestimmungen entstehen könnten, zumal letztere um so unzuverlässiger werden, je geringer die Sproßfreudigkeit der Hefezellen ist.

Versuch Nr.	Zu prüfende Probe		Zahl der Einzell-Aussaaten	Ernte	Nach Stunden	Generationsdauer in Stunden
	Art	Menge ccm				
1	Kontrolle		142	150	48	**über 100**
2	G^{III}	0,5	18	164	24	**7,5**
		1	27	419	48	**12,1**
		5	Keine Vermehrung der Aussaat			
3	G_Z^{III}	1	37	488	16	**4,3**
3′	G_Z^{III}	1	65	1172	18	**4,3**
4	G_Z^{III} st.	1	59	867	18	**4,6**
4′	G_Z^{III} st.	1	72	1449	24	**5,5**
5	F^{III}	1	92	364	18	**9**
6	F_K^{III}	1	75	265	17	**9,4**
7	A_K^{III}	1	49	51	24	**über 100**
8	A_E^{III}	1	46	47	24	**„ 100**
9	G_Z^{III} ohne Minerallösung	1 + 99 ccm dest. Wasser	58	59	28	**„ 100**
10	E	1	68	72	18	**„ 100**

Infolge der oben schon des Näheren begründeten Verwendung vitaminreicher Aussaaten kam es vereinzelt in den Kontrollversuchen zur Anlage eines Sprosses, und zwar hat sich dies unter 142 Bestimmungen 8 mal ereignet, wobei jedoch die Vermehrung bei der Ausbildung eines *einzigen* Sprosses stehenblieb.

8. Versuchsergebnisse.

1. Durch Hinzugabe der aus Gärungsessig erhaltenen Konzentrate zu Mineralnährlösung konnte mittels der Methode der Aussaat einer bestimmten Zellenzahl, vor allem aber mittels des Einzellverfahrens eine wesentliche Herabminderung der Generationsdauer, also eine bedeutende Förderung der Sproßtätigkeit der Hefe festgestellt werden. Bei der Einzellkulturmethode, die ja die wesentlich empfindlichere ist, wurde die Generationsdauer auf weniger als $^1/_{20}$ des Wertes der Kontrolle herabgedrückt (Versuche 3, 3′ und 4). Die in den Konzentraten enthaltenen suspendierten Stoffe üben anscheinend eine hemmende Wirkung aus (vgl. die Versuche 2 und 3), die insbesonders bei höheren Konzentrationen deutlich in Erscheinung tritt; so führte ein Zusatz von 5% des Konzentrates zu der Mineralnährlösung das Ausbleiben jeder Sproßtätigkeit herbei (Versuch 2).

2. Die fraglichen Wuchsstoffe sind gegen die Einwirkung höherer Temperaturen sehr widerstandsfähig; konnte doch selbst ein zweistündiges Erhitzen im Autoklaven bei 2 Atmosphären die Generationsdauer nicht wesentlich verändern (Versuche 4 und 4′).

3. Die die Hefesprossung fördernden Substanzen sind an Fullererde adsorbierbar, und zwar sowohl aus dem Essig unmittelbar (Versuch 5) als auch aus den konzentrierten Produkten (Versuch 6); durch 1%iges Ammoniak lassen sich dieselben aus den Adsorbaten eluieren.

4. Weder die aus den Konzentraten noch die aus den Eluaten gewonnene Asche begünstigt das Hefewachstum (Versuch 7 und 8).

5. Das Konzentrat allein, also nicht zu Mineralnährlösung, sondern zu destilliertem Wasser in der Menge von 1% hinzugesetzt, ist außerstande, eine Hefevermehrung herbeizuführen (Versuch 9).

6. Die fraglichen Wuchsstoffe stammen offenbar aus dem Stoffwechsel der Essigsäurebakterien.

7. Im Gegensatz zum Gärungsessig enthält die Essigessenz *keine* die Hefesprossung irgendwie fördernde Substanz (Versuch 10).

Aus diesen Versuchsresultaten geht hervor, daß dem Gärungsessig Wirkungen zukommen, wie sie den Mikrobenwuchsstoffen, dem sogenannten Vitamin D, zugeschrieben werden. Es wäre natürlich von



besonderem Interesse, durch geeignete Fütterungsversuche festzustellen, ob nicht das mit dem Vitamin D zumeist vergesellschaftete antineuritische Vitamin B ebenfalls darin anzutreffen ist.

Wenn auch über die Bedeutung der im Gärungsessig enthaltenen akzessorischen Nährstoffe für den *menschlichen* Stoffwechsel noch nichts Bestimmtes ausgesagt werden kann, so läßt sich aus unseren Feststellungen doch bereits erkennen, *daß zwischen dem biochemisch entstandenen Gärungsessig und der auf rein chemischem Wege gewonnenen Essigessenz ein prinzipieller Unterschied besteht, der die begriffliche Scheidung beider nach wie vor rechtfertigt.*

Zur Methodik der p_H-Messung CO_2-haltiger Flüssigkeiten bei verschiedenem CO_2-Partialdruck.

Von

A. Beck.

(Aus der Chirurgischen Universitätsklinik Kiel.)

(Eingegangen am 25. August 1927.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Die Wasserstoffionenaktivität der meisten Körperflüssigkeiten liegt bekanntlich in einem Bereich, in dem sie als eine Funktion der CO_2-Spannung bezeichnet werden kann, mit der die Flüssigkeiten im Gleichgewicht stehen. Die genaue Berücksichtigung dieser Spannung ist also bei der Ausführung derartiger Messungen unbedingtes Erfordernis. Die bisher dafür angegebenen Methoden (*Höber*, *Hasselbalch* und *Lundsgaard*, *Michaelis*) hatten zwar im Prinzip das Problem solcher Messungen gelöst, doch hafteten ihnen gewisse Nachteile an, die ihre ausgedehnte Verwendung für biologische Zwecke vor allem im klinischen Betrieb erschwerten oder unmöglich machten. Ich möchte daher im folgenden eine Apparatur angeben, die sich mir in zahlreichsten Untersuchungen sehr gut bewährt hat und die es ermöglicht, auch im klinischen Betrieb auf verhältnismäßig einfache Weise mit einer von der Methode überhaupt zu verlangenden Exaktheit p_H-Messungen in Körperflüssigkeiten bei verschiedener beliebig einzustellender CO_2-Spannung und bei beliebiger Temperatur auszuführen.

Auf die Resultate dieser Messungen soll in einer späteren Arbeit eingegangen werden. Hier soll zunächst nur eine Beschreibung der Methodik erfolgen.

Da bei Messungen mit strömendem Gas (H_2—CO_2-Mischung) schon die geringsten Spuren eines elektrolytisch wirksamen Gases (O_2) unter Umständen die Exaktheit der Potentialeinstellung sehr merklich stören, ist es zunächst nötig, das H_2—CO_2-Gemisch von etwaigen Verunreinigungen mit Sauerstoff zu befreien. Der im *Kipp*schen Apparat entwickelte und in der üblichen Weise durch Kaliumpermanganat und Sublimat gewaschene Wasserstoff ist als praktisch O_2-frei zu be-

trachten, dagegen ist dies nicht immer der Fall bei der in Stahlflaschen käuflichen CO_2. Diese verhält sich sehr verschieden. Es gibt Stahlflaschen, in denen kaum Spuren von Sauerstoff nachweisbar sind, andere sind dadurch ganz erheblich verunreinigt, so daß z. B. eine 5,4%ige H_2—CO_2-Mischung in der *Bunte*-Bürette eine ganz deutliche dunkelgelbe bis braune Verfärbung der alkalischen Pyrogallollösung ergab. Es ist also zunächst notwendig, die CO_2 von dem Sauerstoff zu befreien.

Von den verschiedenen zu diesem Zweck angegebenen Methoden (Absorption durch Phosphor, Chromchlorür u. a.) eignet sich zu diesem Zweck eigentlich nur die Darüberleitung der Gase über glühende Kupferdrahtnetze. Die Aufstellung eines entsprechenden Verbrennungsofens in Kombination mit der sonstigen Gaskettenapparatur ist nicht nur sehr umständlich, sondern verbot sich mir auch durch den Mangel an geeignetem Platz. Ich brachte daher die Kupferdrahtnetze auf elektrischem Wege zum Glühen. Die direkte Erhitzung des Kupferdrahtes durch Durchleitung entsprechend starker elektrischer Ströme hat den Nachteil, daß das Kupfer infolge seines niederen Schmelzpunktes ziemlich rasch abschmilzt. Es ist also nötig, das Kupfernetz auf indirektem Wege zu erhitzen. Dies ließ sich folgendermaßen ausführen.

Um einen Schamottestab mit spiralig verlaufenden Nuten wird Chromnickelband gewickelt. Das Ganze wird dann von einem Mantel aus Kupferdrahtnetz umgeben. Bringt man durch einen Strom von etwa 3,8 bis 4 Ampere das Chromnickelband zum Glühen, so glüht nach kurzer Zeit der ganze Drahtnetzmantel ebenfalls mit. Drei derart hergerichtete Schamottestäbe von je etwa 15 cm Länge wurden hintereinander in einem Verbrennungsrohr angebracht, das Rohr vorne und hinten durch einen Gummistopfen verschlossen, durch den ein Glasrohr und der stromzuführende dicke Kupferdraht geleitet wurde. Der Stromverbrauch beträgt etwa 600 bis 800 Watt. Vor dem Durchleiten des Kohlendioxyds wird zunächst reiner Wasserstoff über die glühenden Kupferdrahtnetze geleitet und dadurch das Kupfer reduziert. Das aus dem Verbrennungsrohr austretende Kohlendioxyd wird noch durch eine Waschflasche mit ausgekochtem destillierten Wasser geleitet. Dadurch, daß die oxydierten Teile des Kupferdrahtnetzes jeweils wieder durch H_2 reduziert werden können, gestaltet sich das Arbeiten äußerst bequem. Bei einer Analyse des Gasgemisches, das auf diese Weise aus H_2 und CO_2 hergestellt wurde, ließen sich mit der *Bunte*-Bürette keine O_2-Spuren mehr nachweisen. Da jedoch als Absperrflüssigkeit in dem Gasometer Wasser bzw. Salzlösung Verwendung findet, die auf der anderen Seite mit der Außenluft in Berührung steht, so war anzunehmen, daß bei längerem Stehen des Gasgemisches über der Absperrflüssigkeit wieder Sauerstoff in das übrige Gas herein-

diffundieren würde, was sich auch durch Analysen bestätigen ließ. Es wäre also nötig, das Gasgemisch, wenn es längere Zeit über der Absperrflüssigkeit gestanden hat, noch einmal auf ähnliche Weise zu reinigen. Versuche mit einer kleineren, sonst ähnlichen Anordnung wie oben beschrieben ergaben jedoch, daß das Gasgemisch H_2-CO_2 sich erheblich beim Durchleiten verändert. Wenn das Gasgemisch z. B. vor dem Durchleiten 5% CO_2 enthielt, ergab eine Analyse hinter dem Verbrennungsrohr nur noch 2% CO_2. Gleichzeitig beschlug sich die abführende Rohrleitung intensiv mit Kondenswasser. Es ist anzunehmen, daß dabei katalysatorische Einflüsse von seiten der Schamotte oder des Chromnickels im Spiele sind und zu entsprechenden Reaktionen Veranlassung geben, da das Gemisch H_2-CO_2 sich nicht verändert, wenn man das Gas über Kupferdrahtnetze leitet, die im Quarzrohr durch Erhitzen des Rohres von außen zum Glühen gebracht sind. Praktisch kann man sich aber einfacher so helfen, daß man nur frisch gemischtes Gas sofort nach dem Einfüllen in die Gasometer verwendet.

Bau und Anordnung der Gasometer selbst.

Als Gasometergefäße verwendete ich zwei kugelige Glasgefäße (alte Röntgenröhren) von 4,5 bzw. 3,5 Liter Inhalt. Diese Kugelform hat verschiedene Vorteile. Einmal läßt sich die Menge, wenn man die Kugel bis in den unteren Hals füllt, ziemlich genau ablesen, und dann steht das Gasgemisch nach erfolgter Einfüllung nur mit einer schmalen Flüssigkeitsschicht in Berührung, was wegen der Löslichkeit der CO_2 in der Absperrflüssigkeit und der O_2-Abgabe dieser Flüssigkeit an das Gasgemisch sehr wertvoll ist. Der Abschluß des Gasometers nach oben hin geschieht durch einen Gummistopfen mit drei Bohrungen. Durch eine ist ein Glasrohr geführt zur Einleitung bzw. Entnahme des Gases, durch die zweite Bohrung führt ein Manometerrohr (*M*), ein N-förmig gebogenes Glasrohr, das mit durch Bordeauxrot gefärbtes Wasser abgeschlossen ist, und durch die dritte Bohrung ist die Achse bzw. das Lager eines im Innern des Gasometers angebrachten Ventilators (*V*) gesteckt, der die Mischung der Gase zu besorgen hat. Die bei der Gasfüllung verdrängte Absperrflüssigkeit läuft zunächst in eine einfache *Wulf*sche Flasche (*W*) mit unterem Auslaufansatz. Diese Flasche steht auf einem durch ein Zahnradgetriebe in seiner Höhe verstellbaren kleinen Tisch. Von dem Verbindungsschlauch zwischen Gasometer und *Wulf*scher Flasche zweigt mittels eines Dreiwegehahns (*Z*) eine weiterer Schlauch ab, der mit einer etwa 260 ccm fassenden Pipette verbunden ist. Diese Pipette (*P*) ist an einem Bürettenständer beweglich angebracht. Auf den Zweck dieser Vorrichtung wird nachher im Zusammenhang noch näher eingegangen werden. Die Gasfüllung des Gasometers geht folgendermaßen vor sich: Zunächst wird durch Heben der *Wulf*schen Flasche der ganze Glasballon mit der Absperrflüssigkeit gefüllt. Dann wird der Wasserstoffhahn (*H*) geöffnet, ebenso der Hahn *K*, der durch einen weiteren Dreiwegehahn (*L*) mit der Außenluft in Verbindung gebracht werden kann. Nachdem das ganze Röhrensystem mit Wasserstoff durchgeblasen ist, wird der Dreiwegehahn *L* geschlossen, d. h. gegen die Außenluft abgesperrt, und die *Wulf*sche Flasche gesenkt. Der Gasometer wird etwa

zur Hälfte mit Wasserstoff gefüllt, darauf die Höhe der Flasche *W* so einreguliert, daß in dem Manometer Gleichgewicht entsteht. Nunmehr erfolgt die Einfüllung einer entsprechenden CO_2-Menge. Das auf die oben angegebene Weise über glühendem Kupferdraht von Sauerstoff befreite CO_2 wird durch Kapillaren dem Dreiwegehahn *L* zugeleitet. Dieser Hahn steht zunächst in Kommunikationsstellung der CO_2-Leitung mit der Außenluft.

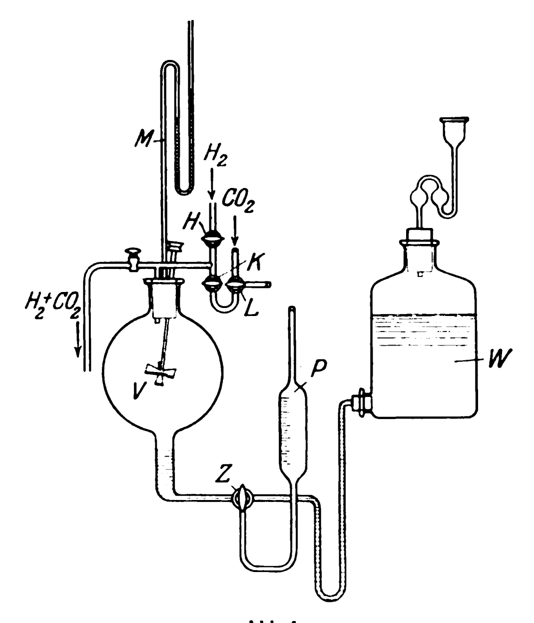


Abb. 1.
Schematische Zeichnung des Gasometeraufbaues.

Nunmehr wird die Pipette *P* durch den Dreiwegehahn *Z* mit dem Gasbehälter in Kommunikation gebracht und der Dreiwegehahn *L* nach genügendem Ausspülen der Leitung mit CO_2 in Kommunikationsstellung der CO_2-Leitung mit dem Innern des Gasometers gestellt. Die beim Einströmen der CO_2 verdrängte Sperrflüssigkeit fließt jetzt in die Pipette ab, die eine exaktere Abmessung der eingefüllten CO_2-Menge ermöglicht, als dies bei der Verdrängung in die große Flasche mit dem breiten Flüssigkeitsspiegel möglich wäre (zur Messung der eingeströmten Kohlensäure muß das Manometer wieder im Gleichgewicht stehen). Ist die gewünschte CO_2-Menge eingefüllt, so wird zunächst der Dreiwegehahn *Z* in Kommunikation mit der *Wulf*schen Flasche gestellt und dadurch die Pipette wieder entleert. Darauf wird der Hahn *Z* wieder in Kommunikation des Gasometers mit der *Wulf*schen Flasche gebracht und der Gasometer vollends mit H_2 aufgefüllt. Nach der Füllung wird das Gasgemisch einige Zeit durch den kleinen Ventilator, der durch einen rasch laufenden Elektromotor angetrieben wird, gründlich durcheinandergemischt. Durch Heben der *Wulf*schen Flasche wird das Gasgemisch unter den nötigen Überdruck gesetzt für die spätere Durchleitung durch die Elektrodengefäße. Das

derart vorbereitete Gasgemisch wird durch eine Leitung aus Glasröhren mit wenigen und ganz kurzen Gummiverbindungen dem Elektrodengefäß zugeleitet. In diese Leitung ist wieder ein Dreiwegehahn eingeschaltet, der eine Verbindung zu einem Gasanalysenapparat herstellt. Es ist auf diese Weise möglich, *während* der Messung eine Probe des durchströmenden Gases zu entnehmen und auf ihren CO_2-Gehalt zu analysieren. Dies ist deshalb wichtig, weil sich mit der Zeit der CO_2-Gehalt des Gases merklich ändern kann infolge der Löslichkeit der CO_2 in der Absperrflüssigkeit (innerhalb 1 Stunde bis zu 0,2 bis 0,3%). Hält man das Gas unter einem gewissen Überdruck, so werden Verunreinigungen durch etwaiges Eindringen von atmosphärischer Luft nicht zu befürchten sein. Anders ist es mit dem Übertritt von Sauerstoff in die Gasmischung aus der Absperrflüssigkeit.

Verwendet man nur ein kurz vor der eigentlichen Untersuchung frisch bereitetes Gasgemisch, so ist am Ende einer etwa einstündigen Untersuchung mit der *Bunte*-Bürette noch keine merkliche Sauerstoffverunreinigung festzustellen, dagegen wird die Pyrogallollösung deutlich braun, wenn das Gasgemisch etwa einen halben Tag über der Absperrflüssigkeit steht.

Neben dem einen Gasometer ist noch ein zweiter, ebenso gebauter aufgestellt. Dieser ist mit der Abflußleitung des ersten durch entsprechende Glasrohrleitungen derart verbunden, daß man durch eine einfache Umstellung eines Hahns beliebig Gas aus dem einen oder anderen Behälter zum Durchströmen durch das Elektrodengefäß entnehmen kann. Der zweite Gasometer wird gleichzeitig mit einem Gasgemisch von etwas anderer Zusammensetzung gefüllt. Auch während der Durchleitung dieses

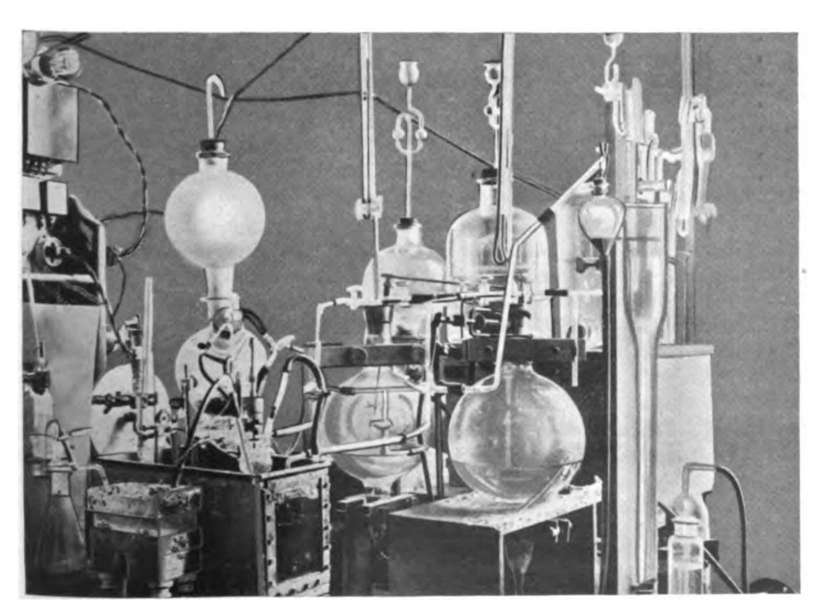


Abb. 2.
Gesamtansicht der beschriebenen Apparatur. Das Elektrodengefäß hängt noch über dem Wasserthermostaten.

Gemisches kann gleichzeitig eine Gasprobe zur Analyse entnommen werden. Außerdem ist es noch möglich, in die zur Elektrode führende Gasabflußleitung reinen Wasserstoff einzuleiten. Man ist also in der Lage, durch das Elektrodengefäß unmittelbar nacheinander reinen Wasserstoff oder zwei verschiedene Wasserstoff-Kohlendioxydgemische durchzuleiten.

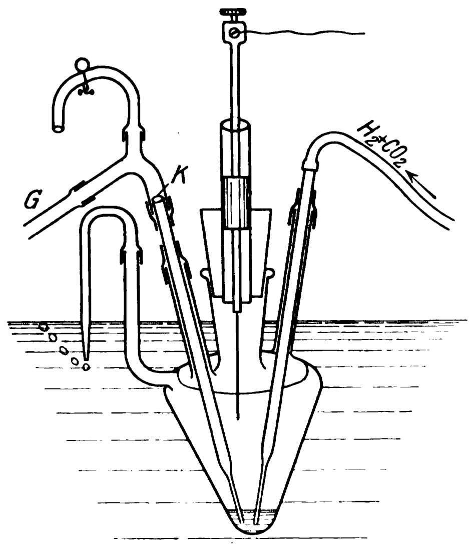


Abb. 3. Elektrodengefäß.
Rechts Gaszuleitung, links Ableitung. G — K = KCl — Agar Verbindung zur Kalomelektrode. In der Mitte in der Höhe verschiebbare Platinelektrode, hochgezogen.

Für das *Elektrodengefäß* hat sich nach verschiedenen Umänderungen eine Form als zweckmäßig herausgestellt, wie sie nebenstehend (Abb. 3) abgebildet ist. Diese hat sich in zahlreichen Messungen sehr gut bewährt. Um die Flüssigkeiten bei ihrer natürlichen Temperatur untersuchen zu können, mußte das Gefäß so gebaut werden, daß es ganz ins Wasserbad versenkt werden kann. Die Anordnung im Luftthermostaten, wie sie *Hasselbalch* und *Warburg* z. B. angeben, ist wesentlich umständlicher. Da das Elektrodengefäß bis zum Hals in das Wasserbad versenkbar sein muß, müssen die Zuleitungen und Ableitungen durch aus dem Wasser herausragende Glasansätze erfolgen. Zu diesem Zwecke trägt das trichterförmig nach unten zulaufende Gefäß vier Ansätze. Der mittlere, große, dient der Einfüllung der Flüssigkeiten und der Durchleitung der Platinelektrode, durch den einen seitlichen Ansatz ist, mittels eines darübergeschobenen Gummischlauches abgedichtet, verschiebbar eine nach unten ausgezogene Glasröhre geführt, durch die das Gasgemisch zugeleitet wird. Das ausgezogene Ende der Glasröhre kann bis in die Spitze des Trichters gesenkt werden. Durch den zweiten Ansatz (*K*) wird eine mit KCl-Agar gefüllte, nach unten ausgezogene Glasröhre durchgeführt. Diese steckt außerdem in einem T-förmigen Glasstück, das auf der einen Seite einen Gummischlauch (*G*) trägt, der in die KCl-Ableitungswanne taucht, auf der anderen Seite einen kleinen Gummischlauch, mit Hilfe dessen die KCl-Lösung aus der Ableitungswanne hoch-

gesaugt werden kann zur Herstellung der leitenden Verbindung mit der Ableitungselektrode. Nach dem Hochsaugen wird einfach der Schlauch, mit dem die KCl-Lösung hochgesaugt wurde, abgeklemmt. Der dritte, kleine, Ansatz dient der Ableitung des Gases. Er ist durch einen Schlauch mit einer Glasröhre verbunden, deren Ende einige Millimeter unter das Wasserniveau des Wasserbades taucht. Auf diese Weise kann man an den ausströmenden Gasblasen die Geschwindigkeit des Durchströmens kontrollieren und durch Abklemmen des zuleitenden Schlauches regulieren. Die eigentliche Elektrode besteht aus einem Platindraht, der an einen Messingstab angelötet ist. Dieser wieder ist in den durchbohrten Kolben einer 1-ccm-Rekordspritze eingelötet. Der nackte Glasmantel einer derartigen Spritze ist durch einen durchbohrten Gummistopfen durchgeführt. Auf diese Weise ist es möglich, die Platinelektrode luftdicht beliebig in der Höhe zu verschieben, was bei der Bedeutung des punktförmigen Eintauchens für die exakte und rasche Endeinstellung unter Umständen von besonderer Wichtigkeit ist. Die Trichterform des Elektrodengefäßes hat auch ihre besondere Bedeutung. Will man die zu messende Flüssigkeit möglichst rasch mit dem Gas ins Gleichgewicht setzen, so läßt man am besten das Gas durch die Flüssigkeit durchperlen. Zu diesem Zwecke wird das ausgezogene Ende des Glasrohres, durch das das Gas eingeleitet wird, bis zur Spitze des Trichters vorgeschoben. Bei eiweißhaltigen, überhaupt bei allen schäumenden Flüssigkeiten stört die Blasenbildung außerordentlich, wenn man nicht dafür sorgt, daß die Blasen nach kurzer Zeit wieder zum Platzen kommen und die Flüssigkeit wieder an den Wänden zurücklaufen kann. In einem Trichter werden die nach oben steigenden Blasen immer breiter, daher ihre Wand auch immer dünner, so daß sie z. B. auch bei Blut im allgemeinen platzen, ehe sie überhaupt oben im Gefäß ankommen. Wird die Blasenbildung je einmal doch zu intensiv, so kann man durch Höherziehen des gaszuleitenden Glasrohres sofort die weitere Blasenbildung unterbrechen und die noch stehenden Blasen durch weiteres Auffüllen mit Gas zum Platzen bringen. Ein anderes Modell eines Elektrodengefäßes, bei dem nach einem kurzen Trichter das Gefäß sich bauchartig kugelig erweitert, so daß die aufsteigenden Blasen rasch sich noch mehr verdünnen und platzen, hat sich deshalb nicht recht bewährt, weil in dem kugeligen Bauch der Überblick infolge störender Reflexe fast unmöglich und damit auch die Regulierung des Eintauchens der Elektrodenspitze sehr erschwert wird. Das Wasserbad selbst wird auf elektrischem Wege geheizt und mit Hilfe eines Toluol-Quecksilber-Thermoregulators auf der gewünschten Temperaturkonstanz gehalten. Der Regulator hat sich auch bei wochenlangem ununterbrochenen Dauerbetrieb stets einwandfrei bewährt. Das Wasserbassin selbst muß vorn und hinten durchsichtig sein, da sonst eine Beobachtung der Elektrode unmöglich ist. Zweckmäßig wird hinter der hinteren Glasplatte eine Glühlampe angebracht, die ihr Licht in das Wasserbassin hineinwirft.

Der weitere Aufbau ist der einer gewöhnlichen Gaskette mit Stöpselrheostat und Kapillarelektrometer.

Für die Messung in dem angegebenen Elektrodengefäß sind Flüssigkeitsmengen von 0,1 bis 0,2 ccm vollkommen ausreichend. Viel mehr als 0,7 bis 1 ccm zu nehmen, ist sogar eher unzweckmäßig wegen des sonst langsameren Einstellens des Gasgleichgewichtes. Läßt man das Gas durch die Flüssigkeit durchperlen, so ist z. B. bei Blutmessungen

die Endeinstellung in 10 bis 15 Minuten erreicht, bei anderen Flüssigkeiten meist wesentlich früher.

Die beschriebene Anordnung erlaubt nun zunächst, zwei Messungen bei verschiedenem Partialdruck der CO_2 auszuführen. Will man bei noch höherer CO_2-Spannung weitere Messungen anschließen, so hat man nur, während die Messung mit dem einen Gasgemisch des einen Gasbehälters im Gange ist, in den anderen etwas CO_2 nachzufüllen. Mit dem Ventilator wird die neue Gasmischung rasch durchgemischt und ist nun sofort verwendungsbereit. Ebenso kann man nachdem in den zweiten Gasbehälter CO_2 nachfüllen. Jeweils wird während des Durchströmens in dem Gasanalysenapparat eine Probe von 10 ccm entnommen und auf seinen genauen CO_2-Gehalt analysiert. Trägt man die verschiedenen Millivolt- und die zugehörigen CO_2-Spannungswerte in ein Koordinatensystem ein, so bekommt man z. B. für Blut bei 37° nebenstehende Kurve.

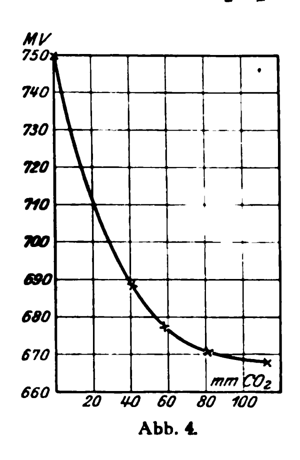


Abb. 4.

Weiter seien noch einige Messungen mitgeteilt, die mit dem Elektrodengefäß bei verschiedener Temperatur ausgeführt wurden:

Kalomelelektr.	21°	— KCl ges. —	2 n H_2SO_4 18° . .	250	Millivolt
,,	21°	— KCl ,, —	2 n H_2SO_4 37° . .	234,2	,,
,,	21°	— KCl ,, —	Standardacetat 18°	517	,,
,,	21°	— KCl ,, —	,, 37°	518	,,
,,	* 20,5°	— KCl ,, —	,, 20°	518	,,
,,	* 37°	— KCl ,, —	,, 20°	521,5	,,
,,	20°	— KCl ,, —	Blut 21°	677	,, } bei 40 mm CO_2-Partialdruck
,,	20°	— KCl ,, —	,, 37°	688	,, }

Bei Verwendung einer zweiten gleichen Elektrode an Stelle der Kalomelelektrode ergeben sich folgende Werte:

2 n H_2SO_4 18° — KCl ges. — 2 n H_2SO_4 37° . . . . 15,8 Millivolt
Blut 18° — KCl ges. — Blut 37° . . 11 Millivolt (bei 40 mm CO_2-Druck)

Auf die Diskussion der Beziehungen des p_H zu den einzelnen Millivoltwerten soll hier zunächst nicht näher eingegangen werden. Es sei nur kurz darauf hingewiesen, daß der für Standardacetat angegebene p_H-Wert 4,62 wohl bei 18°, dagegen nicht $p_H = 4,64$ bei 37° mit den gemessenen Werten übereinstimmt, eine Übereinstimmung jedoch

* Verwendet wurde hier eine andere Kalomelelektrode, nicht die gleiche, mit der die vorangehenden Messungen ausgeführt wurden. Die beiden zeigen eine Differenz von 1 Millivolt.

vorhanden ist, wenn auch die Kalomelelektrode auf 37° gebracht wird. Weiter sei hier noch kurz darauf hingewiesen, daß in den p_H-Tabellen von *Ylppö*, die wohl in den meisten Laboratorien Verwendung finden, die p_H-Werte für 38° nicht mehr mit der *Nernst*schen Formel $\lg \frac{c_1}{c_2} = \frac{E}{RT}$ übereinstimmen und anscheinend unrichtig sind.

Die wenigen Beispiele sollen nur zeigen, wie die angegebene Methodik erlaubt, in bequemer und exakter Weise Messungen an Konzentrationsketten unter verschiedenem CO_2-Druck und bei verschiedener Temperatur auszuführen. Die Einstellung auf die jeweilige Temperatur erfolgt stets sehr rasch. Störungen durch vagabundierende Ströme oder ähnliches sind bei der angegebenen Elektrodenform nicht zu befürchten.

Zur physikalisch-chemischen Kennzeichnung von normalem und pathologisch verändertem Blutserum.

Von

Grete Lasch und Josef Reitstötter (Berlin-Friedenau).

(Eingegangen am 5. September 1927.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

In einer früheren Mitteilung des einen von uns *über die Goldzahl von normalem und pathologisch verändertem Blutserum* (1) und in einer weiteren *über die Sensibilisierung von Ferrihydroxydsolen durch elektrolytfreie Eiweißfraktionen aus normalen und Immunseren* (2) wurde über verschiedene Eigenschaften besonders gereinigter Seren berichtet, ohne daß über deren Gewinnung weitere Mitteilungen gemacht wurden. Da diese Arbeiten sowohl von medizinischer als auch physikalisch-chemischer Seite einige Beachtung gefunden haben und in die Literatur eingegangen sind (3), andererseits auch die von uns schon damals geübten *elektroosmotischen* bzw. *elektrodialytischen* Reinigungsverfahren von Seren von anderen Autoren nachbenutzt, auch teilweise beschrieben und kritisch betrachtet wurden (4), halten wir es für angezeigt, unsere damalige Versuchsanordnung heute noch nachträglich kurz zu beschreiben. Es war schon seinerzeit eine solche Veröffentlichung geplant, doch ist es durch den leider allzu frühen Tod unseres Chefs, Professor *W. G. Ruppels*, bis jetzt noch nicht dazu gekommen.

Die Reinigung der damals von *J. Reitstötter* beschriebenen und gekennzeichneten Seren erfolgte nach einem zuerst von *Botho Graf Schwerin* und *W. G. Ruppel* angegebenen Verfahren, das in der D.-R.-P.-Schrift 355666 vom 8. März 1916 der *Elektro-Osmose A.-G.* beschrieben ist.

Die Heilseren werden bekanntlich aus dem Blute der mit dem betreffenden Toxin immunisierten Tiere hergestellt und enthalten deshalb alle Stoffe des Blutes mit Ausnahme der weißen und roten Blutkörperchen und der Hauptmenge des Fibrinogens bzw. Fibrins, welche hieraus entfernt wurden. Unter den Bestandteilen der Rohseren sind daher eine Reihe unwirksamer, zum Teil sogar für den menschlichen Organismus schädlicher Stoffe vorhanden, wie unwirksame Eiweiß-

körper und Abbauprodukte derselben, Fette, Extraktivstoffe und anderes mehr. Der Wert der Seren wird daher um so günstiger bemessen, je weniger Eiweißkörper und Abbauprodukte in denselben im Verhältnis zum Antitoxin vorhanden sind. Von diesen Verunreinigungen lassen sich Seren auf die folgende sehr elegante Weise mit Hilfe des elektrischen Stromes befreien.

Wird z. B. Diphtherieserum in der für elektro-osmotische Zwecke bekannten dreiteiligen Zelle unter Benutzung geeigneter Diaphragmen der Einwirkung des elektrischen Stromes unterworfen, so wandern die Elektrolyte und die sich wie Elektrolyte verhaltenden Spaltungsprodukte des Eiweißes, sogenannte Extraktivstoffe usw. nach den Seitenräumen ab. Sobald im Mittelraum Elektrolytfreiheit erzielt ist, fallen die Euglobuline zusammen mit einem kleinen Teil der antitoxischen Substanzen aus und können z. B. mit Hilfe einer Zentrifuge beseitigt werden.

Man erhält auf diese Weise bereits ein wesentlich asche- und globulinfreies Serum.

Das so gereinigte Serum enthält neben den spezifischen Substanzen und dem Pseudo- oder Paraglobulin, welches der Hauptträger des Antitoxins ist, noch Albumine sowie eine gewisse Menge von Fetten und fettähnlichen Körpern. Diese letztgenannten kann man, wir folgen hier wörtlich der Patentschrift, da sie nur wenig bzw. kein Antitoxin enthalten, als Verunreinigungen des Heilserums bezeichnen.

Nach dem von *B. Schwerin* und *W. G. Ruppel* angegebenen Verfahren wird nun eine Trennung des Pseudo- oder Paraglobulins von dem mit ihm verunreinigten Albumin, dem Fett und den fettähnlichen Substanzen, und damit die Herstellung eines reinen, spezifischen, antitoxischen Eiweißes erreicht.

Zu diesem Zwecke wird die, wie vorher beschrieben, von den Euglobulinen und Elektrolyten befreite Lösung des Serums im Mittelraum eines Dreizellenapparats zwischen Diaphragmen der Einwirkung des elektrischen Stromes unter Zusatz einer genau bemessenen Menge eines Elektrolyten, z. B. Natriumhydroxyd, zweckmäßig bei hoher Spannung unterworfen wird. Unter diesen Umständen wandern wesentlich nur die Albumine durch das positive Diaphragma nach dem anodischen Seitenraum ab, während das Paraglobulin wesentlich unbeeinflußt im Mittelraum nebst den sonstigen Bestandteilen des Serums zurückbleibt. In dem Maße, wie die Albumine aus dem Mittelraum abwandern, scheiden sich die Fett- und fettähnlichen Stoffe (Cholesterin) des Serums aus und können von dem in Lösung bleibenden Paraglobulin z. B. mit Hilfe einer Zentrifuge abgetrennt werden. Man erhält schließlich eine fast wasserhelle Lösung, bestehend aus Paraglobulin und den spezifischen Substanzen, z. B. dem Antitoxin.

Da der bei dem Verfahren zugesetzte Elektrolyt unter dem Einfluß des Stromes ebenfalls abwandert und schließlich Elektrolytfreiheit eintreten würde, ehe eine vollständige Fraktionierung erfolgt ist, so muß man durch zeitweiliges Hinzufügen von Natriumhydroxyd die günstigen Bedingungen für die Wanderung der Albumine aufrecht erhalten. Der Prozeß der Reinigung ist beendet, wenn durch Halbsättigung einer Probe mit Ammoniumsulfat alles Eiweiß niedergeschlagen wird. Selbstredend wird dann noch bis zur Elektrolytfreiheit zu Ende elektrolysiert.

Über die Wichtigkeit der Wahl geeigneter Diaphragmen wird noch später ausführlich berichtet werden. Allgemein kann gesagt werden, daß man zweckmäßig an der Kathode vegetabilische Substanzen verwendet, wie Pergamentpapier, Viskose (Transparit, Cellophan) und dergleichen, an der Anode dagegen ein solches aus tierischer Haut (vegetabilisch oder mineralisch gegerbtem Leder, Rinds- oder Pferdeblasen usw.).

Der Apparat zur Ausführung dieses Verfahrens ist die bekannte dreiteilige Zelle, wie sie schematisch in Abb. 1 dargestellt ist. Durch die beiden Diaphragmen 6 und 7 wird dieselbe in die Räume 1, 2 und 3 geteilt. Hinter den Diaphragmen liegen die Pole 4 und 5. In den Mittelraum des Apparats 3 kommt das zu reinigende Serum, in die Räume 1 und 2 destilliertes Wasser. Das Diaphragma 7 besteht aus Pergament, das Diaphragma 6 aus tierischer Haut oder einem sonst geeigneten Stoff. Abb. 2 zeigt den gleichen Apparat in photographischer Darstellung; es bezeichnen 1 das Endteil des Apparates, 2 die Versteifungsstäbe und 3 die Metallbacken zum Festklemmen. 4 ist der Kathodenraum, 5 die Kühlvorrichtung, 6 das kathodische Diaphragma (Pergament) und 7 endlich die Anode (Pt-Netz).

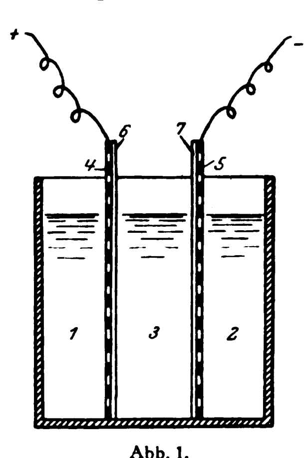


Abb. 1.
Elektrodialysierapparat nach Botho Graf *Schwerin* (schematische Darstellung).

Die anzuwendende Stromstärke richtet sich ganz nach der Menge der vorhandenen Elektrolyte und der durch den Stromdurchgang bedingten Wärmetönung; es ist selbstredend, daß man das Serum nicht über etwa 35° erhitzen darf. Die Angaben in der Patentschrift weisen hier eine Lücke auf, da die Mitteilung der Spannung und der Stromstärke ohne gleichzeitige Angabe der wirksamen Diaphragmenoberfläche (Stromdichte) gar nichts besagt; wie aber vorstehend ausgeführt,

ist dies auch durchaus unwesentlich, da sich die Stromrelationen einzig und allein nach der Wärmetönung richten. Es ist also stets für eine gute Kühlung der gesamten Apparatur zu sorgen. Man sieht auf der Photographie in Abb. 2 auch in den beiden Seitenräumen die für das Kühlwasser vorgesehenen Kühlschlangen.

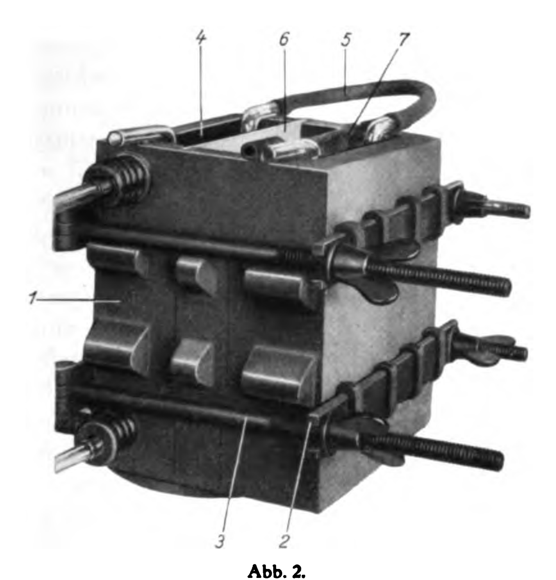


Abb. 2.
Elektrodialysierapparat nach Botho Graf *Schwerin* der Deutschen Ton- und Steinzeugwerke A.-G., Berlin-Charlottenburg.

Auf diese Art erhielten wir also bei der ersten Behandlung die sogenannten *Euglobuline*, die wir nicht weiter untersuchten, da sie in reinem Wasser unlöslich sind und daher im Sinne unseres Arbeitsprogramms, nur mit salzfreien Eiweißstoffen zu arbeiten, für unsere weiteren Versuche nicht herangezogen werden konnten. Die *Paraglobuline* gewannen wir, nachdem das Natriumhydroxyd aus dem Mittelraum durch Elektrolyse entfernt war, in reinster Form aus diesem, und die *Albumine* schließlich in einem dem anodischen Seitenraum vorgeschalteten vierten Raum, dem anodischen Mittelraum, auf die gleiche Weise in elektrolytfreiem Zustande. Einen solchen Vierzellenapparat, wie auch wir ihn benutzten, haben kürzlich *R. Fricke* und Mitarbeiter beschrieben (5) und an Hand hübscher schematischer Zeichnungen erläutert. Da der Apparat, nachdem er schon vom Grafen *Schwerin* angegeben worden ist, seinerzeit auf *P. H. Prausnitz* und unsere Anregung hin von den *Deutschen Ton- und Steinzeugwerken* in *Berlin-Charlottenburg* gebaut wurde und vielfachster Anwendung im Laboratorium fähig ist, soll er auch hier nochmals be-

*

schrieben werden. Abb. 3 stellt ein Endstück dar, die Abb. 4 und 5 Mittelstücke verschiedener Breite. Die Tröge werden in der gewünschten Länge, Zellenzahl und Zellengröße zusammengesetzt, wie sie in den Abbildungen wiedergegeben sind. Die einzelnen Stücke besitzen plangeschliffene Ränder *r*, mit denen sie leicht aufeinandergekittet werden können. Die zur Abtrennung der einzelnen Räume voneinander benutzten Diaphragmen werden an den betreffenden Stellen zwischen die Schliffe gelegt und dann der Trog, wie aus Abb. 6 ersichtlich ist, in einem Rahmen fest zusammengeschraubt. Dieser Rahmen besteht z. B., wie ihn *R. Fricke* beschreibt, aus den beiderseits mit Gewinden versehenen Messingstäbchen *s*, *s'* mit den Schraubenmuttern *m*, *m'* und den Unterlegeringen *r*, *r'*, sowie aus den beiden Holzbacken *b*, *b'*. Der Vergleich dieser schematischen Abbildungen mit der Photographie der von uns verwandten Apparatur zeigt ihre prinzipielle Gleichheit. Als Elektroden benutzten wir grobmaschige Netze aus Platindraht, die wir, wie die Abb. 1 und 2 zeigen, dicht an die Diaphragmen verlegten, während *R. Fricke*, von dem die schematische Zeichnung der Abb. 6 stammt, die Elektroden von den Diaphragmen in größerem Abstand anordnet, was aber unseres Erachtens unzweckmäßig ist.

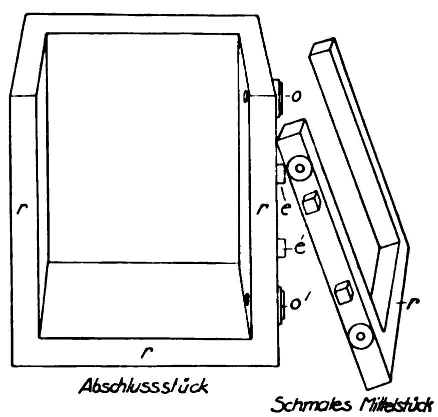


Abb. 3. Endstück eines Elektrodialysierapparates.

Abb. 5. Mittelteil eines Elektrodialysierapparates.

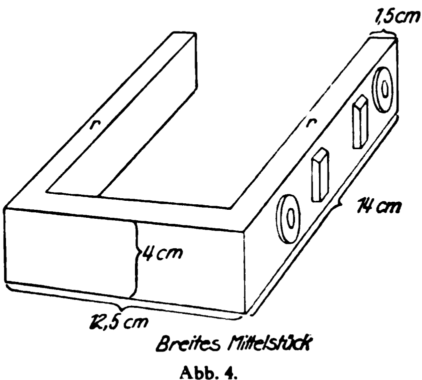


Abb. 4. Mittelteil eines Elektrodialysierapparates.

Wie der eine von uns schon in seinen früheren Mitteilungen betont hatte, ist die Wahl geeigneter Diaphragmen *wesentlich* für die erzielten Erfolge. Über die Bedeutung der Diaphragmen ist in den letzten Jahren ein heftiger Streit entbrannt (6), der heute, besonders dank den Veröffentlichungen *H. Freundlichs* und *L. F. Loebs* (7) so weit geklärt ist, als diese Forscher auf Grund sorgfältiger Untersuchungen zu dem

Ergebnis gekommen sind, daß die Wahl der Diaphragmen dann *gleichgültig* ist, wenn man nur mit *schwachen* Strömen arbeitet, dann aber auch die Vorteile der Elektrodialyse gegenüber der einfachen Dialyse nur verschwindend klein sind, arbeitet man dagegen mit *starken*

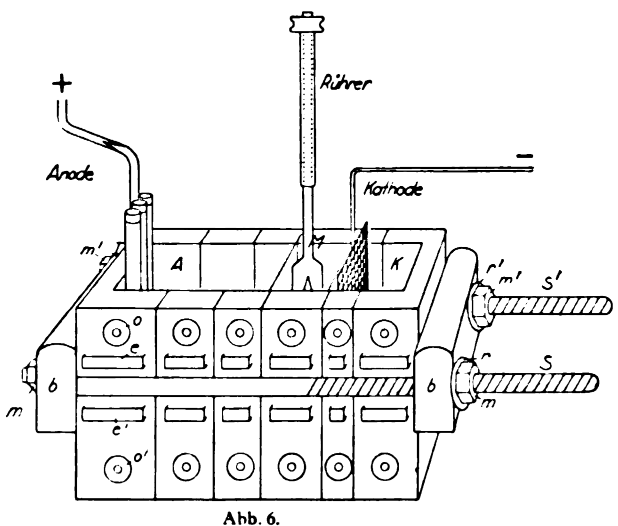


Abb. 6.
Schematische Zeichnung von *R. Fricke* des Botho Graf *Schwerin*schen Elektrodialysierapparates.

Strömen, so ist die Verwendung bestimmter Diaphragmenkombinationen sehr *wesentlich*. *H. Freundlich* und *F. L. Loeb* bestätigen, daß die von *W. G. Ruppel* und *uns* (8) zuerst angewendete Diaphragmenkombination die für die Praxis geeignetste darstellt. Sie besteht aus einem positiven Diaphragma aus Wollstoff mit chromierter und belichteter Gelatine, während als negatives Diaphragma Pergamentpapier verwendet wird. Arbeitet man dagegen, wie schon erwähnt, nur mit sehr schwachen Strömen, etwa von 0,8 bis 0,3 Milliamp./qcm, so ist es in der Tat gleichgültig, welche Diaphragmen man benutzt.

Neuerdings vertritt nun *L. Reiner* (9) wieder die Ansicht, daß es gleichgültig ist, welche Diaphragmen man verwendet, wenn man nur die Elektrodialyse „geeignet" leitet. *L. Reiner* hat bei seinen Überlegungen angenommen, daß die Badflüssigkeiten während der Elektrodialyse sich in *Ruhe* befinden; dies trifft aber *niemals* zu, da alle Autoren, die bisher elektrodialytische Reinigungsverfahren angewendet haben, die zu reinigenden Flüssigkeiten auch stark rührten. Dadurch werden aber die Schlüsse *Reiners* hinfällig, womit nicht bestritten werden soll, daß man nach unendlich langer Zeit bei Anlegung entsprechend schwacher Ströme schließlich stets, gleichgültig, welche Diaphragmen

man verwendet, zu einer dem isoelektrischen Punkt des nicht-diffusiblen Ampholyten sehr naheliegenden Azidität gelangt.

Ebenso wichtig, vielleicht noch wichtiger als bei dem vorher beschriebenen Verfahren, halten wir die Wahl geeigneter Diaphragmen bei dem folgenden Verfahren, das von uns ebenfalls sehr mit Vorteil zur Reinigung und Darstellung der einzelnen Fraktionen der Seren angewendet wurde. Einen Unterschied in den Eigenschaften der einzelnen Fraktionen, die nach dem einen oder anderen Verfahren dargestellt waren, haben wir nie beobachtet.

Die *Euglobuline* werden auf dem gleichen Wege wie bei dem früheren Verfahren gewonnen. Die weitere Trennung der *Paraglobuline* von den *Albuminen* erfolgt nun in bekannter Weise durch fraktionierte Salzfällung. Man versetzt das Gemisch der Zentrifugate, Filtrate und Waschwasser von der Euglobulinabscheidung mit einem gleichen Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung und sammelt das sich dabei ausscheidende Paraglobulin durch Filtration oder mittels der Zentrifuge. Nach gründlichem Auswaschen mit halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung löst man diesen Niederschlag in Wasser auf und unterwirft die Lösung einer neuerlichen Elektrodialyse bis zur Elektrolytfreiheit. Man erhält so eine hellgelbe, klare Lösung der Paraglobuline.

Die Albumine schließlich erhält man durch Elektrodialyse der gesammelten Filtrate, Waschwässer usw. dieser Fällung in gleicher Weise.

Bei diesen Elektrodialysen ist aber noch ein weiterer Kunstgriff notwendig, damit die zu reinigenden Flüssigkeiten nicht zu sauer werden. Da bis jetzt noch keine Diaphragmenkombination gefunden wurde, die imstande ist, alle Neutralitätsstörungen zu kompensieren, besonders, da die NH_4'-Ionen rascher abwandern als die anderen, wird der Mittelraum daher selbst bei Verwendung von chromierter und belichteter Gelatine als positives Diaphragma und von Pergamentpapier als negatives Diaphragma leicht sauer. Dies läßt sich aber vermeiden, wenn man, einem Vorschlage der *Elektro-Osmose A.-G.* folgend (10), die ungeeigneten Ionen vor der Elektrodialyse gegen geeignete austauscht. In dem vorliegenden Gemisch von Eiweiß und Ammoniumsulfat wird das ungeeignete SO_4''-Ion durch das Anion der Essigsäure ersetzt, indem man mit der entsprechenden Menge Bariumacetat umsetzt und das ausfallende Bariumsulfat durch Zentrifugieren entfernt. Das verbleibende Gemisch von Ammoniumacetat und Eiweiß bleibt unter Verwendung der von uns benutzten und bereits geschilderten Diaphragmenkombination während der nun folgenden Elektrodialyse dauernd sehr nahe um den Neutralpunkt, so daß keinerlei Eiweißfällungen zu befürchten sind (4).

Erwähnt sei noch, daß wir stets mit relativ *starken* Strömen, d. h. etwa von 0,01 bis 0,5 Amp./qcm, arbeiteten und für gute *Kühlung* sorgten; die schließlich angelegte Spannung betrug immer 500 Volt, wobei die Stromstärke nicht größer war als bei Füllung des Apparats mit destilliertem Wasser, also nur Bruchteile von Milliamp. betrug. Die Dauer der Einwirkung des elektrischen Stromes bis zur Erreichung dieser Elektrolytfreiheit variierte naturgemäß von Fall zu Fall, betrug aber nie über 4 Stunden. Eine Schädigung spezifischer Immunstoffe durch den elektrischen Strom bei der Verarbeitung im Elektrodialysierapparat tritt *niemals* ein, was durch zahlreiche Tierexperimente nachgewiesen wurde.

Wir glauben im vorstehenden gezeigt zu haben, daß die zu den von dem einen von uns bereits mitgeteilten Versuchen zur Bestimmung der *Goldzahl* von normalem und pathologisch verändertem Blutserum ebenso wie die zu den Versuchen zur *Sensibilisierung* von Ferrihydroxydsolen durch Eiweißfraktionen benutzten Eiweißlösungen sowohl einheitlich als auch rein und frei von fremden Beimengungen und Verunreinigungen waren, auch glauben wir gezeigt zu haben, daß die von uns angewandten Verfahren so eindeutig definiert sind, daß die mittels derselben hergestellten Produkte es ebenfalls sind, soweit dies eben bei Eiweißfraktionen überhaupt möglich ist. Wir sind daher der Ansicht, daß es zu weit geht, wenn man die von uns und unseren Mitarbeitern gemachten Beobachtungen und dabei gewonnenen Vorstellungen als „geradezu grotesk" bezeichnet. Wir stehen durchaus nicht an, alle Ansichten *W. G. Ruppels* zu teilen, und halten die von diesem Forscher u. a. gegebene Definition der Euglobuline als hydrophobe Kolloide (11) durchaus für eine Entgleisung, doch ändert dies nichts an der Tatsache der Richtigkeit der von *W. G. Ruppel* und seinen Mitarbeitern gewonnenen experimentellen Beobachtungen. Es wird immer verwechselt zwischen der Erklärung von Erscheinungen und der Beobachtung derselben. Erklärungen von Erscheinungen und Theorien können falsch sein und sich im Laufe der Zeiten ändern, nicht angängig ist es aber, einen Unterschied zu konstruieren zwischen „technischen" Untersuchungen und „wissenschaftlichen" Versuchen, denn es ist nicht ersichtlich, worin dieser bestehen soll. Soll damit gesagt sein, daß technische Untersuchungen unsauber sind, dann hätten sie ja überhaupt keinen Wert und fielen außerhalb des Kreises der Betrachtungen, soll aber damit nur gesagt sein, daß es sich um Versuche im großen Maßstabe handelt, so ist nicht einzusehen, warum gerade die dabei gewonnenen Ergebnisse geringer oder anders bewertet werden sollen, als die bei Laboratoriumsversuchen.

Daß es sich bei den auf vorbeschriebene Weise dargestellten Eiweißfraktionen tatsächlich um einheitliche, eindeutig und hinreichend

definierte Eiweißkörper handelt, glauben wir unter anderem aus den bereits früher mitgeteilten Sensibilisierungsversuchen entnehmen zu können, die bekanntlich zu dem bemerkenswerten und durchaus exakten Ergebnis geführt haben, daß Pseudoglobuline aus antitoxischen Seren einem Ferrihydroxydsol gegenüber eine andere Sensibilisierung ausüben als die Pseudoglobuline aus normalen oder antiinfektiösen Blutseren. Diese Untersuchungen wurden dann in der Folge unabhängig von uns durch *H. Freundlich* und *W. Beck* (12) wiederholt, wobei unsere früheren Versuchsergebnisse vollinhaltlich bestätigt werden konnten. Es ergab sich wieder, daß sich die Albumine nicht voneinander unterscheiden, wohl aber wirken Pseudoglobuline aus Diphtherie-, Dysenterie- und Tetanusserum stärker sensibilisierend als die Pseudoglobuline aus Normalserum. Die Pseudoglobuline aus antiinfektiösem Schweinerotlaufserum unterschieden sich auch bei der Untersuchung von *H. Freundlich* und *W. Beck* nicht vom normalen Pseudoglobulin.

Wie sehr vorsichtig man aber mit „einheitlichen" Körpern in der Eiweißchemie sein muß, zeigen besonders die Versuche zur Bestimmung der *Goldzahl.* So konnte der eine von uns früher zeigen (13), daß sich unter der nach den üblichen Verfahren abgeschiedenen Euglobulinfraktion noch ein Eiweißkörper befinden muß, der gegenüber kolloidem Golde *keine* Schutzwirkung ausübt, vielmehr sogar auf ein Goldsol fällend wirkt, während die elektrodialytisch gereinigten Fraktionen diesen Körper nicht enthielten. Eine Isolierung dieses Körpers ist *J. Reistötter* damals nicht gelungen. Er hatte der Ansicht zugeneigt, diesen identisch mit dem von *F. W. Schulz* und *R. Zsigmondy* seinerzeit bei der Fraktionierung von Hühnereiweiß aufgefundenen und ebenfalls ein Goldsol fällenden Körper zu setzen. Wie aber *E. Joel* (14) sehr richtig bemerkt, ist dies von vornherein kaum anzunehmen, da *F. W. Schulz* und *R. Zsigmondy* jenen fraglichen Körper bei der Verarbeitung einer ganz anderen Fraktion, nämlich der Albuminfraktion, vorfanden. *H. Freundlich* und *E. Löning* glauben, diesen von *J. Reitstötter* vermuteten Körper als ein *Protamin* ansprechen zu können, da das von ihnen untersuchte *Clupeinsulfat*, das ein Protamin ist und in den Euglobulinen vorhanden sein kann, ebenfalls in geringen Konzentrationen schon fällend auf alkalische Goldhydrosole wirkt, während bei höherer Konzentration ihm eine, wenn auch nicht starke, Schutzwirkung zukommt.

Wir glauben daher besonders im Anschluß an die genannten Untersuchungen sowie im Hinblick darauf, daß die nach dem von uns angewendeten Verfahren hergestellten Eiweißfraktionen stets eine Schutzwirkung aufwiesen, daran festhalten zu müssen, daß in nach den üblichen Verfahren abgeschiedenen Euglobulinen noch Fremdkörper, vielleicht *Clupein*, enthalten sind, die auf Goldsole nicht nur keine Schutzwirkung

ausüben, sondern sie sogar fällen. Ob dieser Körper oder diese Körper, wie der eine von uns vermutet hat, identisch sind mit dem im pathologischen Liquor vorkommenden, das Goldsol fällenden Körper, oder ob die Fällung des Goldsols durch den Liquor im Sinne *E. Joels* ein reiner Verdünnungseffekt ist, erscheint uns noch immer *nicht* genügend geklärt. Wenn *E. Joel* zu der Schlußfolgerung gelangt, daß *keine* zwingende Notwendigkeit vorliegt, die Goldreaktion pathologischer Liquore mit qualitativen Veränderungen der Eiweißkörper in Verbindung zu bringen, so möchten wir dem hinzufügen, daß aber gerade auf Grund unserer Versuche, die durch die Beobachtungen *H. Freundlichs* und *E. Lönings* ergänzt werden, auch keine zwingende Notwendigkeit besteht, solche Veränderungen von vornherein abzulehnen und daher eine endgültige Entscheidung darüber weiteren Versuchen vorbehalten bleiben muß.

Wir sind auch noch immer der Ansicht, den Serumeiweißstoffen eine Schutzwirkung zuschreiben zu müssen, da den von uns gereinigten Fraktionen, wie *J. Reitstötter* schon mitgeteilt hat, eine recht bemerkenswerte Schutzwirkung zukommt und diese Fraktionen, wie wir in dieser Mitteilung gezeigt haben, durchaus als elektrolytfrei anzusprechen sind (2) (13)[1].

Zusammenfassung.

Es werden die von *B. Graf Schwerin* und *W. G. Ruppel* angegebenen Verfahren zur Eiweißfraktionierung, die zur Darstellung der in früheren Mitteilungen (1) (2) (13) benutzten und beschriebenen Eiweißfraktionen gedient haben, beschrieben, erläutert und kritisch betrachtet, wobei gezeigt wird, daß diese Verfahren die Gewinnung von im üblichen Sprachgebrauch einheitlichen, wohl definierten und elektrolytfreien Eiweißfraktionen gestatten.

Es wird auf Versuche von *H. Freundlich* und *W. Beck* hingewiesen, welche die seinerzeitigen Befunde *J. Reitstötters* über das *Sensibilisierungsvermögen* von Eiweißfraktionen bestätigen.

Es wird schließlich dargelegt, daß, wenn auch keine zwingende Notwendigkeit vorliegt, die *Goldreaktion* im pathologischen Liquor mit qualitativen Veränderungen der Liquoreiweißkörper in Verbindung zu bringen, auch keine zwingende Notwendigkeit besteht, diese von vornherein abzulehnen, da es tatsächlich gelungen ist, den Eiweißstoffen nahestehende Stoffe zu isolieren, welche die charakteristischen Reaktionen hervorzurufen imstande sind.

---

[1] *E. Joel* irrt, wenn er mitteilt (S. 4), daß der eine von uns den Albumin- bzw. Globulingehalt auf elektroosmotischem Wege festgestellt hat, nur die Reinigung und Abscheidung dieser Fraktionen geschah auf dem vorher beschriebenen Wege.

Literatur.

1) *J. Reitstötter*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **30**, 468, 1920. — 2) *Derselbe*, ebendaselbst **30**, 507, 1920; Kolloidzeitschr. **28**, 20, 1921. — 3) Unter anderen *R. Doerr* und *W. Berger*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **93**, 156, 1921; *E. O. Grütz*, Arch. f. Dermatol. u. Syphilis **139**, 432, 1922; *L. Farmer Loeb*, diese Zeitschr. **142**, 11, 1923; *St. Bächer* und *M. Kosian*, ebendaselbst **145**, 326, 1924; *R. Zsigmondy* und *E. Joel*, Zeitschr. f. physik. Chem. **113**, 305, 1924. — 4) *R. Stern*, Centralbl. f. Bakteriologie, Parasitenkunde usw. **75**, 572, 1923; Klin. Wochenschr. **2**, 1412, 1923; diese Zeitschr. **144**, 115, 1924; *H. Freundlich* und *L. F. Loeb*, ebendaselbst **150**, 522, 1924; *G. Ettisch* und *W. Beck*, ebendaselbst **171**, 443, 1926; *Wo. Pauli* u. a., ebendaselbst **152**, 355, 1924. — 5) *R. Fricke*, *F. A. Fischer* und *H. Borchers*, Kolloidzeitschr. **39**, 152, 1926. — 6) *R. Reitstötter*, ebendaselbst **32**, 20, 1923; *Wo. Pauli*, diese Zeitschr. **152**, 355, 1924. — 7) *H. Freundlich* und *L. F. Loeb*, ebendaselbst **150**, 522, 1924. — 8) *Elektro-Osmose Akt.-Ges.*, Dänisches Patent 33578; vgl. auch *R. Stern*, diese Zeitschr. **144**, 120, 1924. — 9) *L. Reiner*, Kolloidzeitschr. **40**, 123, 1926. — 10) *Elektro-Osmose Akt.-Ges.*, D. R.-P. Nr. 354327. — 11) *W. G. Ruppel*, Deutsch. Med. Wochenschr. **1923**, Nr. 2; Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **97**, 188, 1922. — 12) *H. Freundlich* und *W. Beck*, diese Zeitschr. **166**, 190, 1925. — 13) *J. Reitstötter* u. a., Österr. Chem.-Ztg. **25**, 123, 1922; Kolloidzeitschr. **43**, 35, 1927. — 14) *E. Joel*, Das kolloide Gold in der Biologie und Medizin, Leipzig 1925, S. 15ff. — 15) *H. Freundlich* und *E. Löning*, Kolloid. Beihefte **16**, 20, 1922

Einwirkung des Ultraviolettlichtes auf die Serumkolloide.

Von

Walter Göbel.

(Aus dem Deutschen Kriegerkurhaus Davos-Dorf und dem Schweizer. Institut für Hochgebirgsphysiologie und Tuberkuloseforschung in Davos.)

(Eingegangen am 6. September 1927.)

In zahlreichen Untersuchungen der letzten Jahre, besonders aus dem Schweizerischen Institut für Hochgebirgsphysiologie und Tuberkuloseforschung wurden die Einwirkungen der beiden prinzipiellen, bisher isolierten Faktoren des Höhenklimas: der Luftverdünnung und der Strahlung auf den menschlichen und tierischen Organismus eingehend studiert.

Schon frühzeitig bekannt war die Vermehrung von Gesamtblut, Hämoglobin und Erythrocyten als Folge der Luftverdünnung (*Abderhalden, Loewy, Knoll, Laquer, Müller, Lippmann* usw.). Dazu kam die Kenntnis der Blutdrucksteigerung bei Sauerstoffmangel (*Lüscher, Loewy* und *Grossmann*), der Vertiefung der Atmung (*Loewy, Hediger* und *Rohrer*). Stoffwechseluntersuchungen führten zur Aufdeckung beträchtlicher Stoffwechselsteigerung (*Loewy, Brieger*), besonderer Stoffwechselstörungen (*Loewy, György, Viale, Laubender*) und azidotischer Vorgänge als Wirkung der Anoxämie (*Barcroft, Galeotti, Durig* und *Zuntz, Loewy, Gigon, Michaelis-Lehmann, Fritz*).

Unter dem Einfluß der für das Strahlenklima des Hochgebirges charakteristischen Ultraviolettstrahlen (um 300 $\mu\mu$) zeigten *Kestner* und *Hediger* Blutdrucksenkung. *Rothmann* führte diese auf Änderung des Sympathicotonus durch die Strahlung zurück. *Pincussen* wies Steigerung des Eiweißzerfalls und Anomalien im Abbau der Purinkörper nach. *Kroetz* fand nach Bestrahlung Auftreten von Acidose, die dann in Alkalose umschlug. Die von *Pincussen, Hess* und *Unger, Sonne, Schultzer, Gates* und *Grand, Lasch* studierte Verschiebung des Ca : K-Gleichgewichtes unter Bestrahlung beansprucht das besondere Interesse der Tuberkuloseforschung. Hämolytische Vorgänge, Resistenzerhöhung der Erythrocyten und Mechanismus der Blutregeneration bei Ultraviolettbestrahlung waren Gegenstand von Untersuchungen von *Hasselbalch, Loewy,* von *Rhoden, Baumann, Kestner, Hobert* u. a. Das Verhalten

der Blutfermente studierten *Viale* und *Pincussen*. *Königsfeld* fand Erhöhung des Agglutinin-Präcipitin- und des Hämolysintiters nach Ultraviolettbestrahlung.

Diese Effekte der Ultraviolettbestrahlung konnten kaum primärer Natur sein, sondern mußten mehr oder weniger als Folgeerscheinungen, als Effekt der Bestrahlung auf den Gesamtkörper gedeutet werden. In interessanten Versuchen zeigte *von Schubert*, daß die durchblutete Haut weniger Ultraviolettstrahlen reflektiert als die nicht durchblutete. Es mußte also vom strömenden Blut oder unter seinem Einfluß von den durchbluteten Geweben Strahlenenergie aufgenommen worden sein. *Schläpfer* konnte photographisch nachweisen, daß bestrahltes Blut Energie aussendet. Es war zu erwarten, daß die mit der Strahlung absorbierte Energie in irgend einer Form außer als Wärme unmittelbar im Blut nachgewiesen werden konnte. Dabei war es im Prinzip gleichgültig, auf welche Weise diese Energie absorbiert und transformiert würde, ob nach *Dessauer*schen oder *Holthusen*schen Anschauungen.

Auf der Suche nach Methoden, solche primäre Beeinflussung durch Ultraviolettbestrahlung aufzufinden, erwies sich die *Oberflächenspannungsbestimmung* des Blutserums als geeignet, nachdem die Blutsenkung wegen ihrer Bedingheit durch zu viele und zu variable Faktoren wenig eindeutige Resultate ergab. Lediglich durch Röntgenbestrahlung in vitro wurde deutliche Verlangsamung der Blutkörperchensenkung erzielt, eine Tatsache, die auch in einer unterdessen erschienenen Arbeit von *Ernst Pohle* festgestellt wird. Ultraviolettlicht schien die Senkung nur wenig und unsicher im Sinne einer Beschleunigung zu beeinflussen.

Eine Reihe von Vorversuchen zeigte zunächst eindeutige Veränderung der Serumoberflächenspannung bei Bestrahlung in vitro.

Methode.

Das Blut wurde unter Stauung aus der Armvene steril entnommen, das Serum durch Absetzenlassen des Blutkuchens und Abzentrifugieren gewonnen. Hämolytisch gewordene Seren wurden nicht verwertet. Jedes Serum wurde gleichzeitig in zwei Portionen bestrahlt (5 Minuten, 50 cm Abstand), und zwar Portion a) in Reagenzgläschen aus gewöhnlichem Glase, Portion b) in Reagenzgläschen aus Quarzglas. Unterschiede mußten bei dieser Methode Effekte der Stahlenfraktion sein, für die Quarzglas mehr durchlässig ist als gewöhnliches Glas, also der Ultraviolettstrahlen. Die Oberflächenspannung wurde durch zehnmaliges Auszählen mit dem Stalagmometer von *Traube* bestimmt. Die Tropfenzahl gebe ich unten umgerechnet auf ein Normalstalagmometer, welches 100 Wassertropfen gibt, an (Zn).

Es ergibt sich konstant mehr oder weniger starke Verringerung der Oberflächenspannung der Seren unter dem Einfluß der Ultraviolettbestrahlung. Dieses Ergebnis steht in einem gewissen Gegensatz

Tabelle I.

	Gewöhnliches Glas	Quarzglas
Ko.	115,0	117,2
Gö.	114,5	118,3
Bo.	114,7	116,7
Co.	115,7	117,8
Schu.	113,0	117,1
Mo.	111,7	115,5
Pi.	115,2	118,2

zu den Untersuchungen von *Siedentopf*, welcher nach Ultraviolettbestrahlung kolloidaler Lösungen Erhöhung der Oberflächenspannung, d. h. Verringerung der Dispersität, fand. Nach Röntgenbestrahlung fanden *Wels*, *Paul* und *Thiele* allerdings Erhöhung der Dispersität von Eiweißlösungen, doch handelt es sich beim Blutserum um ein so kompliziertes kolloidales System, daß Abweichungen von dem Verhalten einfacher Kolloidlösungen wohl zu verstehen sein dürften.

Die nächste Versuchsreihe betraf die Einwirkung der Ultraviolettbestrahlung auf das Blutserum in vivo. Um Fehlerquellen, z. B. die Einflüsse der Nahrungsaufnahme auf die kolloidalen Reaktionen des Serums (*Robert E. Mark*) soweit als möglich zu vermeiden, wurde folgende Methodik in Anwendung gebracht.

Beide Oberarme der Versuchspersonen wurden mit Gummibinden so gestaut, daß die Armvenen deutlich hervortraten, der Radialispuls aber beiderseits gleich stark fühlbar war. Darauf folgte Bestrahlung der einen Vorderarmbeugeseite mit der Quarzlampe (5 Minuten, 40 cm Abstand). Der andere Arm wurde vor Strahlung geschützt. Hierauf Blutentnahme kurz nacheinander, wahllos, zuerst aus dem bestrahlten oder unbestrahlten Arm. Das Serum wurde durch Absetzenlassen und Abzentrifugieren gewonnen. Hämolytische Seren wurden nicht verwendet. Die Oberflächenspannung wurde wie oben bestimmt. Hierbei ergaben sich zwei verschiedene Reaktionsweisen.

Bei den in Tabelle II zusammengestellten Fällen hatte die Oberflächenspannung deutlich zugenommen, im Gegensatz zu den in Tabelle III angeführten. In beiden Tabellen habe ich außerdem die Dauer

Tabelle II.

	Zn unbestrahlt	Zn bestrahlt	Differenz	Aufenthalt im Hochgebirge
Li.	116,7	111,0	— 5,7	2 Monate
Ko.	114,2	110,4	3,8	1 Monat
Ma.	116,8	113,2	3,6	2 Monate
Schä.	118,5	115,1	3,4	2 „
Sei.	113,6	111,4	2,2	2 „
Tho.	118,0	116,3	1,7	1 Monat
Wi.	117,2	116,0	1,2	3 Monate
Au.	111,9	111,3	0,6	2 „

Tabelle III.

	Zn unbestrahlt	Zn bestrahlt	Differenz	Aufenthalt im Hochgebirge
Ba.	113,6	118,5	+ 4,9	6 Monate
Gö.	111,8	116,4	4,6	12 „
Krö.	112,9	116,1	3,2	6 „
Ni.	113,1	115,6	2,5	21 „
Jä.	114,6	116,1	1,5	7 „
Krei.	111,5	112,9	1,4	6 „
Schlü.	112,8	113,2	1,4	5 „
Bau.	112,6	113,9	1,3	6 „
Bo.	115,2	116,3	1,1	5 „
Schä.	111,8	112,9	1,1	6 „

des Hochgebirgsaufenthalts der betreffenden Versuchspersonen angegeben. Beim Vergleich des Reaktionstyps mit der Dauer des Hochgebirgsaufenthalts ergibt sich zunächst die Tatsache, daß die Fälle, welche mit Erhöhung der Oberflächenspannung reagiert hatten, durchweg erst relativ kurze Zeit im Hochgebirge lebten. Im Gegensatz dazu hielten sich die Personen, welche mit Erniedrigung der Oberflächenspannung reagierten, schon wesentlich länger im Hochgebirge auf. Die Versuche ergeben einwandfrei:

1. Die Oberflächenspannung des Serums wird durch Ultraviolettbestrahlung in vivo beeinflußt. Ob es sich um rein qualitative oder auch um quantitative Änderung der Serumeiweißkörper handelt, läßt sich bei der Versuchsanordnung nicht einwandfrei entscheiden. Doch ist kaum anzunehmen, daß in der kurzen Zeit zwischen Bestrahlung und Blutentnahme Eiweißkörper etwa aus dem Stratum germinativum in das Blut übertreten und die quantitative Zusammensetzung desselben verändern konnten. Ob die Umgestaltung der kolloidalen Struktur der Serumeiweißkörper rein physikalisch-chemischer Natur ist oder ob auch rein chemische Prozesse mitspielen, ist nicht sicher zu entscheiden, aber wohl anzunehmen (*Kroetz*).

2. Die Versuchspersonen, welche erst relativ kurze Zeit im Hochgebirge lebten, reagierten mit Erhöhung der Serumoberflächenspannung, Versuchspersonen mit längerem Hochgebirgsaufenthalt mit Erniedrigung. Ob es sich hier um die Wirkung von Anpassungsvorgängen handelt, muß dahingestellt bleiben, der Schluß liegt jedenfalls nahe, bei den vielen analogen Beispielen gerade der Hochgebirgsphysiologie. Festzustellen ist noch, daß irgend ein Zusammenhang zwischen der Pigmentation des bestrahlten Hautgebietes und der Größe oder Richtung des Reaktionsausschlages nicht beobachtet werden konnte.

Mit der Feststellung der kolloidalen Zustandsänderung der in vivo bestrahlten Serumeiweißkörper scheint mir experimentell die Brücke geschlagen von Strahlentherapie zu Proteinkörpertherapie. *Klinisch*

hat man beide in ihren Effekten längst in Parallele gesetzt. Bekannt ist die Störung des Wasserhaushalts nach Ultraviolettbestrahlung und nach Proteinkörperinjektion (zunächst strömt Wasser in das Blut ein, dann folgt Eindickung des Blutes), ferner die Verschiebung des Ionengleichgewichts im Blute (*Kroetz*), ferner der lähmende Einfluß auf das Wärmezentrum (*Bier*) und neuerdings auch die Beschleunigung der Blutkörperchensenkung (*Leicher*), die Erhöhung des Präcipitin- und Agglutinintiters (*Koenigsfeld*) und die von *Colebrook*, *Eidinow*, *Hill*, *Bannermann* festgestellte Vermehrung der Bakterizidie. Die Wirkung der Ultraviolettbestrahlung dürfte folgendermaßen zu erklären sein: Die absorbierte Strahlenenergie wird schon in den Hautkapillaren transformiert, wahrscheinlich nicht nur in physikalisch-chemische Energie (Erhöhung der Dispersität bedeutet Energiespeicherung), sondern auch in rein chemische (Strukturumlagerung, Spaltung und Paarung irreversibler Art). Die so veränderten Serumeiweißkörper rufen, wenn sie mit den übrigen hochdispersen, oberflächenaktiven Kolloiden des Gesamtorganismus in Reaktion treten, jene Allgemeinwirkung hervor, die wir kennengelernt haben als Effekte sowohl der Ultraviolettbestrahlung als auch der Proteinkörperinjektion. So wirken beide im Sinne der Kolloidtherapie (*Luithlen, Widal*) über eine mehr oder weniger ausgeprägte lokale oder allgemeine kolloidoklastische Krise. Reizvoll ist, daß auf dem Wege der Strahlentherapie sich so Perspektiven in Richtung exakt dosierbarer unspezifischer Reiztherapie eröffnen.

Zusammenfassung.

1. Durch Ultraviolettbestrahlung in vivo wird die Oberflächenspannung des Blutserums verändert. Experimentell ist damit eine Brücke geschlagen zum Verständnis der Ultravioletttherapie als Analogon der Proteinkörpertherapie.

2. Die Versuchspersonen, welche erst kurze Zeit im Hochgebirge lebten, reagierten mit Erhöhung der Oberflächenspannung. Solche, die schon längere Zeit im Hochgebirge lebten, reagierten mit Erniedrigung. Es wird an die Wirkung von Anpassungsvorgängen gedacht.

Literatur.

Bier, Über die Transfusion von Blut, Münch. med. Wochenschr. 1901. — *Dessauer*, Strahlungstherap. **20**, H. 2, S. 307. — *Dorno*, Schriften des Instituts für Hochgebirgsphysiol. in Davos, H. 1, S. 59. — *Derselbe*, Studie über Licht und Luft im Hochgebirge, 1911. — *Durig, v. Schrötter, Zuntz*, diese Zeitschr. **39**, 461, **1912**. — *G. Fritz*, ebendaselbst **170**, 236, **1926**. — *Gigon*, Verhandlung der klimatologischen Tagung. Davos 1925. — *Gottlieb* und *Freund*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **98**. 1922. — *György*, Schweiz. med. Wochenschr. Nr. 18, 1924. — *Hasselbalch*, diese Zeitschr. **19**, 435,

1909. — *Hediger*, Schweiz. med. Wochenschr. **1923**, Nr. 14. — *Hobert*, Klin. Wochenschr. **1923**, Nr. 53. — *Kroetz*, Klin. Wochenschr. Jahrg. **4**, S. 631; diese Zeitschr. **151**, 146, 449, **1924**. — *Laquer*, Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 1. — *Lasch*, Deutsch. med. Wochenschr. **47**, Nr. 36. — *Laubender*, diese Zeitschr. **162**, 459, 1925; **165**, 427, 1925. — *Leicher*, Zeitschr. f. Laryng. Rhinol. u. ihre Grenzgeb. **13**, H. 4/5, S. 329. — *Lippmann*, Klin. Wochenschr. 1926, Nr. 32. — *Loewy*, Der heutige Stand der Physiologie des Höhenklimas, Berlin 1926; Berlin. klin. Wochenschr. 1912, Nr. 3; Klin. Wochenschr. 1925, Nr. 17. — *Loewy* und *Förster*, diese Zeitschr. **145**, 318, 1924. — *Loewy* und *Mayer*, Klin. Wochenschr. 1926, Nr. 27. — *Lüscher*, Schweiz. med. Wochenschrift 1923, Nr. 21. — *Luithlen*, Zusammengef. Vorlesung über Pharm. der Haut, Berlin 1921. — *Robert E. Mark*, Pflügers Arch. **212**, H. 1, S. 95. — *Pincussen*, Deutsch. med. Wochenschr. **47**, Nr. 11; diese Zeitschr. **150**, 360, 1924; **161**, 62, 1925; Strahlentherapie **18**, 625. — *Pohle*, Radiology **6**, Nr. 1, Ref. Zentralbl. f. d. ges. Tuberluseforsch. — *Riedel*, Strahlenther. **12**, H. 2, S. 36. — *v. Schroetter*, ebendaselbst **11**, 605. — *v. Schubert*, Deutsch. med. Wochenschr. 1926, Nr. 22. — *Sonne*, Verhandl. d. klimatol. Tagung in Davos 1925. — *Wels, Paul, Thiele*, Pflügers Arch. **209**, H. 1, S. 49. — *Widal*, *Abrami*, *Brissaud*, Presse med., Jahrg. 29, Nr. 19, S. 181.

Verfetten embryonale Zellen?[1]

Von

Georg Rosenfeld (Breslau).

(Eingegangen am 7. September 1927.)

Die Skizze, die ich als eine neuerdings zu Ende geführte, im Jahre 1910 begonnene Arbeit vorlegen möchte, betrifft das Gebiet der Geschwulstentstehung.

Vor diesen 17 Jahren gab es drei Theorien: Die Ableitung der Geschwulst von embryonalen Keimen, die Entstehung durch wiederholte Reizwirkungen und eine Art Infektionstheorie. In diesen Jahren sind hochbedeutende Entdeckungen über dieses Thema gemacht worden; die Reiztheorie ist durch die Röntgen-, Teer-, Arsen- und Paraffinkrebse gestützt worden, die Embryonaltheorie durch die Erzeugung bösartiger Tumoren von *Askanazy* durch die Einspritzung von Embryonalbrei bei arsengefütterten Ratten, die parasitäre Theorie durch die Krebse, die *Fiebiger* mit Spiroptera, einer Filiariaart, erzeugt hat, die von anderen bei Cysticercus, bei Bilharzia gesehen worden sind[2]. Diese parasitären Krebse sind keineswegs als Infektionsgeschwülste aufzufassen, denn nirgendwo sind in ihnen die Parasiten nachweisbar gewesen: sie sind nichts als Reiztumoren, bei deren Entstehung die Parasiten die Reize für die Gewebe waren, aus denen die Tumoren — analog wie die Teerkrebse — entstanden.

Diese Vielzahl der Ursachen hat also die alte Zweiteilung der Ursachen nicht geändert; es bleibt bei der Entstehung der Tumoren aus wachsenden Zellen, seien es Regenerationszellen, wie sie der Reiz erschafft, sei es aus embryonalen Zellen, Gebilden, die ihre enorme Wachstumskraft den Tumorzellen stets nahegestellt hat.

So wäre alles nahezu beim alten. Aber der wesentliche Fortschritt ist in anderen Erkenntnissen zu suchen; es wird an den Tumorzellen die *Entspezifizierung* als das Wichtige angesehen; sie dienen nicht oder meist nicht dem Aufbau eines Organs, wie es normale Regenerations- und normale Embryonalzellen tun, es sind nach *Fischer-Wasels* Ausdruck *kataplastisch* veränderte Zellen, Zellen, die sich chemisch (durch K-Überschuß, durch Abänderung der Phosphatide, der Fermente), die sich physikalisch (in Permeabilität, Oberflächenspannung, in Beschaffenheit der kolloidalen Dispersion), die sich im Stoffwechsel (Atmung und Gärung) unterscheiden.

---

[1] Vortrag, gehalten in der medizinischen Sektion der Schlesischen Gesellschaft für vaterländische Kultur am 17. Juni 1927.

[2] Die wichtigen Arbeiten von *F. Blumenthal*, 4. Stoffwechselkongreß, S. 16, Berlin 1924, mögen hier außer Betracht bleiben.

Eben auf dem letzten Gebiete haben ja die Entdeckungen *Warburgs* gezeigt, daß die Krebszelle die Eigenschaft besitzt, sich in anaerobiotischem Leben durch Gärung, und zwar Milchsäuregärung, zu erhalten; sie ist imstande, von allen Geweben die größte Milchsäureproduktion zu entfalten.

Gerade diese kataplastische Abänderung der Krebszelle in allen Richtungen gilt als ihr Kennzeichen: z. B. zu gleicher Milchsäureproduktion ist die Embryonalzelle nur im Zustande der Erstickung befähigt. Und so bietet die Frage der Unterschiedlichkeit oder der Gleichheit zwischen Krebszelle auf der einen Seite und der Regenerations- oder Embryonalzelle andererseits noch immer ein Interesse dar. Wenn also 1909 *Hess* und *Saxl* behauptet haben, daß Krebszellen und Embryonalzellen die Unfähigkeit zu verfetten gemeinsam hätten, so ist das heute noch ein Thema, das im Rahmen des Kataplasieproblems eine gewisse Aufmerksamkeit verdient, denn nur *funktionelle* Unterschiede haben sich zwischen Krebs- und Embryonalzelle ergeben: Der *morphologische* Standpunkt ist noch etwa der von *Virchow*: daß die feinsten Teile des Carcinoms „sich nicht wesentlich vom primitiven Gewebe des Embryos unterscheiden", oder der *Hansemanns*, daß isolierte Carcinomzellen nicht von irgend einer anderen Zelle unterscheidbar seien. So ist es wirklich angebracht, die Carcinomzelle auf etwaige spezifische Funktionseigenheiten zu prüfen.

Hess und *Saxl* haben bei ihren Untersuchungen in dieser Richtung[1] sowohl bei den Zellen der Tumoren wie der embryonalen Organe die Fähigkeit, Verfettung unter bestimmten Bedingungen zu zeigen, vermißt und sehen in dieser funktionellen, wenn auch pathologisch funktionellen Gleichheit eine Stütze der *Cohnheim*schen Lehre.

Hess und *Saxl* haben also zunächst die Anschauung gewonnen, daß Carcinomzellen nicht auf Phosphor verfetten. Die Autoren haben das in erster Reihe durch Phosphorvergiftungen an Carcinom-Mäusen und -Ratten studiert. Sie fanden, wenn sie solchen Tieren mehrere Tage Phosphor injizierten, zwar Verfettung der Leber usw., aber beim Rattensarkom, auch beim Mäusecarcinom keine Osmiumfettschwärzung. Bei letzterem waren die Tumorzellen ganz fettfrei, dagegen die Wanderzellen mit Fett erfüllt. Die Autoren haben noch den anderen Weg benutzt, welchen die Untersuchungen von *Mavrakis*[2] gezeigt hatten. Wenn man Phosphor in physiologischer Kochsalzlösung der Leber eines eben getöteten normalen Tieres injiziert, so tritt bei alsdann eingeleiteter Autolyse während einiger Stunden eine intensive mikroskopisch verfolgbare Verfettung auf, welche lediglich auf einem Sichtbar-

[1] *Leo Hess* und *Paul Saxl*, Zur Kenntnis der spezifischen Eigenschaften der Carcinomzelle, Beiträge zur Carcinomforschung, herausgegeben von *H. Salomon*, H. 1, Berlin-Wien 1909.

[2] Arch. f. Anat. u. Phys. 1904, S. 95.



werden des Fettes beruht. *Hess* und *Saxl* injizierten gelben Phosphor in Leber, Niere, Herz, Hoden, Magen, Darm von normalen Tieren und fanden stets nach 6- bis 8stündigem Aufenthalt der in physiologischer Kochsalzlösung (unter Toluolzusatz) suspendierten Organen im Brutschrank mehr oder minder starke Osmiumreaktion. Wurden aber Rattensarkome oder Mäusecarcinome in gleicher Weise behandelt, so blieben sie vollständig von Osmiumschwärzung frei. Auch bei menschlichen Lebercarcinomen fanden sie das gleiche Freibleiben von Fettkörnchen bei den Tumormassen, während das umgebende normale Lebergewebe Osmiumreaktion zeigte.

In gleichem Verfahren untersuchten die Autoren embryonale Organe, und zwar verglichen sie Nieren der Embryonen von Meerschweinchen und Kaninchen unter Phosphorautolyse mit Nieren und Leber der Muttertiere. Dabei fanden sie in den embryonalen Nieren keine Spur von Osmiumschwärzung.

So kommen *Hess* und *Saxl* zu dem Schlusse, daß es eine Eigentümlichkeit der Embryonalzelle ist, in gleicher Weise wie die Carcinomzelle jene Zellreaktion, die auf Phosphorzusatz eintritt, vermissen zu lassen.

Die Autoren haben den Weg nicht eingeschlagen, die Verfettung der embryonalen Organe am *tragenden Tiere* zu untersuchen. Sie sagen: „Auf eine intravitale Phosphorintoxikation konnte von vornherein nicht eingegangen werden." Die Erklärung hierfür dürfte wohl in der Schwierigkeit der Materialbeschaffung zu suchen sein. In der Tat ist es sehr schwer, eine systematische Reihe solcher Experimente anzustellen, denn sichere Ergebnisse sind wohl nur am Hunde zu erwarten, und bei der Hündin ist die Diagnose der Gravidität und deren Dauer nicht ohne Schwierigkeiten, ganz abgesehen von der Umständlichkeit, tragende Hündinnen zu erhalten.

Trotz dieser Schwierigkeiten gelang es, allmählich genügend Material zusammenzubringen, um diese Frage in dieser Hinsicht zu untersuchen. Der erste Fall war eine Vergiftung mit Phlorrhizin.

Nr. J. 87. Hündin wiegt nach fünftägigem Hunger am 28. Juli 1909 9,5 kg. Sie erhält am 28. und 29. Juli je 2,0 g Phlorrhizin und an beiden Tagen zusammen 150 g Gelatine, ohne zu erbrechen. Sie wird am 30. Juli vormittags durch Verbluten getötet.

Sie ist tragend und offenbar dicht vor dem Wurf; die fünf kleinen Hunde bewegen sich lebhaft und quietschen, als sie aus der Amnionblase entfernt sind.

Von vier dieser Hunde wird die Leber entnommen, getrocknet und in vierstündiger Ätherextraktion der Fettgehalt bestimmt.

Hund	1,	Leber,	feucht	15 g = 3,65 g	trocken,	enthält	2,67 % Fett,
„	2,	„	„	15 g = 3,7 g	„	„	3,021 % „
„	3,	„	„	16 g = 3,8 g	„	„	2,34 % „
„	4,	„	„	14 g = 3,7 g	„	„	2,97 % „

Diese Fettprozentzahlen stehen im schärfsten Gegensatz zum Fettgehalt der mütterlichen Leber.

Leber der Hündin wiegt feucht 210 g, davon 70 g feucht = 25 g trocken, enthält 28,5% Fett.

Hier ist die zehnfache Menge von dem in den fötalen Lebern enthaltenen Fett zu konstatieren.

Es kann in diesem Falle keine Frage sein, daß *keine Verfettung der Fötenlebern* eingetreten ist, denn weniger Fett als in ihnen kann gar nicht enthalten sein. Im Gegenteil ist es gewiß erlaubt, diese Lebern als „normal fetthaltige Fötenlebern" anzusehen.

Dieser erste Entscheid in Richtung der *Hess-Saxl*schen Angaben konnte aber kein definitiver sein, denn dazu ist das Phlorrhizin ein zu mildes Agens. In den angewandten Dosen entzieht es das Glykogen nur mit mäßiger Energie — veranlaßt ja auch nur eine mittlere Leberverfettung in der Mutterleber, und schwerlich reicht seine Wirkung bis an die Glykogenbestände des Fötus heran, in der Art, daß die nötigen Phlorrhizinmengen die Föten erreichen, obzwar das Phlorrhizin in Spuren im Amnionwasser nachweisbar war —. Nun ist aber Glykogenentziehung die unerläßliche Vorbedingung für das Zustandekommen einer Verfettung[1]. Wenn man sich des Phlorrhizins bei der Lösung des Problems von der Verfettung embryonaler Zellen bedienen will, so wäre es ratsamer, eben geworfene Hunde zur Untersuchung zu verwenden, denn auch sie sind noch ganz und gar aus embryonalen Zellen zusammengesetzt, und für sie muß noch gelten, was für Föten gilt, soweit es die Zellnatur betrifft. Zugleich wird die verfettende Kraft des Phlorrhizins völlig ausreichen.

J. 91. Neugeborener Hund erhält am 17. August 1909 60 mg Phlorrhizin, am 18. und 19. August je 0,1 g Phlorrhizin subkutan unter Hunger und wird am 20. August 1909 durch Chloroform getötet. Gewicht des Tieres 320 g, Gewicht des Felles 72 g = 20 g trocken, der Körper des Hündchens 200 g feucht = 43 g trocken, Gewicht der Leber 15 g feucht = 3,6 g trocken, Fett im Körper 8,78%, im Fell 10,56%, zusammen 5,879 g Fett, Fett in der Leber 15,14%.

Ob hier eine Verfettung eingetreten ist, ist erst dann zu entscheiden möglich, wenn Untersuchungen an nicht vergifteten Tieren über den normalen Fettgehalt der Fötenlebern vorliegen.

Zunächst sind als solche — wenn Kleinheit des Fettgehalts die normale Beschaffenheit beweist — die Lebern von J. 87 aufzuführen.

Ich verfüge noch über einen Fall einer trächtigen, nicht vergifteten, gefütterten Hündin.

K. 68 wird im Futter etwa 2 Tage vor dem Wurfe getötet. Sie enthält vier Föten, die durch lautes Schreien und starke Bewegungen ihre Lebensfähigkeit beweisen.

Die Lebern von 1 und 2 werden zusammengenommen (Föten I), sowie die von 3 und 4 (Föten II).

Fötenlebern I 28 g feucht = 7 g trocken, enthalten 3,66% Fett, Fötenlebern II 26 g feucht = 7 g trocken, enthalten 3,08% Fett. Diese Zahlen beweisen, daß auch die Zahlen von J. 87 normal sind. Am 5. Mai 1927

[1] Immer im Sinne von *Fettinfiltration* zu verstehen, da Verfasser eine fettige Degeneration nicht anerkennt.



wurde einer 2 Tage hungernden trächtigen Hündin durch Bauchschnitt der Uterus mit acht wurfreifen Föten entnommen. Die Lebern wurden in zwei Gruppen zusammengefaßt untersucht.

U. 1. Lebern 1 bis 4 feucht 90 g, trocken 21,1 g. Fett = 2,64%, N = 6,2%.

Lebern 5 bis 8 feucht 80 g, trocken 19,6 g. Fett = 2,96%, N = 6,31%.

Das Mittel des Fettgehalts der 16 normalen Fötenlebern ergibt sich also aus J. 87, K. 68 und U. 1 *als 2,91% Fett.*

Gehen wir jetzt an die Erörterungen anderer Vergiftungsversuche an trächtigen Tieren.

Bei der Hündin K. 7 liegt ein Versuch vor, der orientieren soll, ob Gelatine die Fähigkeit hat, die durch Natrium benzoicum bewirkte Leberverfettung aufzuheben. Die Hündin wiegt nach fünftägigem Hunger am 20. Oktober 1909 9 kg. Sie erhält am 20. und 21. Oktober je 9 g Natrium benzoicum und die Hälfte von 135 g Gelatine (7,5 g pro Kilogramm und Tag) und wird am 22. Oktober 1909 nachmittags getötet. Fett ist reichlich vorhanden. Die Hündin enthält vier gut entwickelte Föten, welchen die Lebern entnommen werden.

Die Föten wiegen 390 g feucht, trocken 60 g, die Fötenlebern 32 g feucht, trocken 8,5 g, enthalten 8,88% Fett und 7,17 N.

Die Leber der Mutter wiegt 180 g, 70 g davon feucht = 23 g trocken, enthalten 27,72% Fett und 11,06% N.

Hier finden wir zwar nur den dritten Teil der Fettmengen, welche bei der Mutter auftreten, aber doch viel höhere Zahlen als bei den Normaltieren.

Die noch zur Verfügung stehenden Beobachtungen sind vier Phosphorvergiftungen.

K. 57 ist eine Hündin, die mit viel zu geringen Phosphordosen behandelt worden ist. Die Mutter zeigte weder klinisch die Symptome der Phosphorvergiftung deutlich, noch war der Fettgehalt der Leber des Muttertieres hoch genug; es fanden sich nur 19,28% Fett in der Lebertrockensubstanz.

Die Lebern der fünf Jungen wogen 69 g feucht = 18 g trocken und enthielten 5,16% Fett.

Hier ist die Fettzahl der Fötenleber zu unbedeutend erhöht, um eine sichere Beurteilung zuzulassen[1].

Bei K. 62 ist die Phosphorvergiftung von intensiver Wirkung gewesen. Die Leber des Muttertieres (372 g schwer) enthält 78,52% Fett in der Trockensubstanz.

Die Lebern der fünf Föten wogen 110 g feucht = 21 g trocken und enthielten 13,78% Fett.

Damit haben wir eine Vermehrung des Fettes in den Fötenlebern auf das 4½fache des normalen Prozentgehalts erreicht.

---

[1] Es ist auch nicht absolut ausgeschlossen, daß die Tiere durch ein einmaliges Trinken an der Mutter ihren Leberfettgehalt erhöht haben. Bei allen anderen Tieren sind die Muttertiere vor dem Wurf entweder getötet worden oder gestorben.



Bei K. 65 hat die Leber der Mutter durch Phosphorvergiftung einen Fettgehalt von 45,30% der Trockensubstanz.

Die Lebern der acht Föten wiegen 140 g feucht = 20,05 g trocken und enthalten 10,50% Fett.

Wiederum das 3½fache der Norm an Fett in den fötalen Lebern!

K. 66 ist eine tragende Hündin, die der Phosphorvergiftung schon nach 4 Tagen erlegen ist. Darum hat die Leber des Muttertieres nur 33,7% Fett. Die Lebern des ersten und zweiten Fötus wiegen zusammen 50 g feucht = 9 g trocken und enthalten 9,06% Fett.

Die Lebern des dritten und vierten Fötus wiegen zusammen 45 g feucht = 8 g trocken und enthalten 11,32% Fett.

Das gleiche Ergebnis der Fettvermehrung wie vorher!

Stellen wir nun auch noch die Fettprozente bei den vergifteten Föten zusammen, so erhalten wir 9,78% im Mittel.

Nun kann noch der Versuch J. 91 am neugeborenen Hunde dazu gerechnet werden, dann würde die Mittelzahl 10,061% betragen.

Generaltabelle.

Nr.	Fett in der Leber der Mutter %	Fett in der Leber der Föten %	
J. 87	28,5	2,67	Phlorrhizin, Föten nicht verfettet
	28,5	3,021	
	28,5	2,34	
	28,5	2,97	
K. 68	28,5	3,66	Normal
	28,5	3,08	
U. 1	28,5	2,64	
	28,5	2,96	
	Mittel 2,91% Fett in der Leber		
K. 7	27,72	8,88	Natr. benzoic. (ungenügende Dosis)
K. 57	19,28	5,16	
K. 62	78,52	13,78	Phosphor
K. 65	45,30	10,50	
K. 66	33,7	9,06	
	33,7	11,326	
J. 91	33,7	15,14	Neugeborener, Phlorrhizin
		Mittel 10,06%*	

* Ohne K. 57 11,48%.

Wir sehen also, daß durch die geschilderten Vergiftungen eine Vermehrung des Fettes in der Leber der Föten von rund 3% auf rund 10% erreicht wird, d. h. von einem embryonalen Organ, der Leber nämlich, ist nachgewiesen, daß es verfettet.

Es könnte der Glykogengehalt der Hundeföten die Prozent*zahl* des Fettes störend beeinflussen, denn es ist denkbar, daß durch das Schwinden des Glykogens die absolut gleiche Fettmenge mit höherer Prozentzahl erscheint. Bei meinen Untersuchungen an Kaninchenföten habe ich allerdings niemals so hohe Glykogenwerte gefunden (in maximo 2,7% im ganzen Fötus!), daß ihr Wegfall die Prozentzahl bei gleichem absoluten Fettgehalt

wesentlich beeinflussen könnte[1]. Daß nun die Prozentzahlen für die Leber der Föten überhaupt so niedrig liegen, hat seinen Grund sowohl in den sehr niedrigen Anfangswerten des Fettes in der Fötenleber und dann darin, daß es dem Gifte wahrscheinlich sehr schwer fällt, in genügender Menge in den Fötus einzudringen und den Glykogengehalt herabzusetzen. Selbst im hungernden Muttertiere können Kaninchenföten noch Reste von Glykogen behalten, wenn das Muttertier schon glykogenarm oder -frei ist.

	Nahrung	Glykogen		
		in der Mutter		in den Föten
		Leber %	Körper %	%
Trächtiges Kaninchen III . .	0	0	0,03	0,15
„ „ V . .	0	0,132	0,108	0,254

Also selbst der Hunger wirkt nicht gleich stark glykogenentziehend auf Mutter und Föten.

Bei Erwägung dieser Umstände sind die erhaltenen Leberfettzahlen ein Zeichen für die Verfettungsmöglichkeit der fötalen Hundeleber. In Betracht kommt auch das geringe Quantum Fett, das in den Föten überhaupt zur Fettwanderung verfügbar ist: Ist doch in dem ganzen neugeborenen Hündchen der gesamte Fettvorrat noch kaum 6 g, so daß es eigentlich wunderbar genug ist, daß bei ihm überhaupt eine Fettwanderung in die Leber zustande gekommen ist[2].

Es ist nun nicht schwer, die Dehiszenz zwischen den Befunden von *Hess* und *Saxl* und den meinigen aufzuklären.

Sie haben embryonale Organe mit der durch Phosphor nach *Jacobys* Vorgang verstärkten Autolyse behandelt und keine Verfettung gesehen.

---

[1] Eine Überlegung verdient folgende eigenartige Tatsache bei den Fötenlebern. Wenn man die Analysenzahlen von U. 1 und K. 7 betrachtet, so finden wir einen N-Gehalt von U. 1: 6,2% und 6,31% und 2,64% Fett, bei K. 7: 7,17% N und 8,88% Fett. Rechnet man nun den Eiweißgehalt nach dem gewöhnlichen Ansatz N mal 6,25 aus, so ergibt sich bei U. 1 rund $6{,}3 \times 6{,}25 = 39{,}4\%$ Eiweiß + 2,6% Fett = 42% statt 100%.

Was sind die fehlenden 58%? Glykogen auf keinen Fall, auch nicht Inosit! Ebenso ist die Rechnung bei K. 7 = 44,8% Eiweiß, 8,9% Fett = 53,7% statt 100%. Auch hier fehlen 47%, die bisher unerklärlich sind. Aber auf die Berechnung der Fettprozente haben sie keinen Einfluß, besonders da U. 1 ein normales, K. 7 ein verfettetes Tier ist. Bei der Mutter K. 7 mit 27,7% Fett und 69,1% Eiweiß ist ein Rest nicht vorhanden!

[2] Man könnte auch die Frage aufwerfen, ob das Fett der Fötenlebern vom wandernden Fett der Mutter herstammt; aber in diesem Falle würde wohl die Fettmenge in den Fötenlebern, z. B. bei K. 62 mit 78% Fett, in der Mutterleber höher zu erwarten sein; freilich hängt das von den Glykogenrückständen in der Fötenleber ab. Die Fettinfiltration beim Neugeborenen J. 91 spricht einigermaßen dagegen. Im übrigen ist es belanglos, woher die Fettinfiltration kommt; wenn sie nur da ist, beweist sie die Möglichkeit ihres Entstehens.



Es wird nun aber durch diesen Modus kein Fett neu erzeugt oder neu hingezogen, sondern nur vorhandenes sichtbar gemacht. Es handelt sich nur um eine Phanerose des Fettes. Und natürlich nur eines Teiles des vorhandenen Fettes. Denn niemals sehen wir auch nur annähernd das ganze vorhandene Fett. Ist nun der Fettgehalt so niedrig, wie es bei den embryonalen Lebern der Fall ist, knapp 3 %, so ist gar keine Chance vorhanden, daß von diesem Minimum etwas sichtbar gemacht wird. Das dürfte die wahrscheinlichste Erklärung für die Differenz in den Meinungen der beiden Autoren und von mir sein[1].

Ob das Ausbleiben der autolytischen Phanerose der von *Hess* und *Saxl* gewählten Tumoren auf der gleichen Fettarmut beruht, weiß ich nicht; ich aber habe bei Lebermetastasen des Menschen 23 % Fett gefunden, so daß auch bei diesen die Verfettungsmöglichkeit erwiesen ist. Daß es eine Phanerose bei menschlichen Tumoren gibt, ist durch die Tatsache bekannt, daß *Virchow*, wenn nicht primo loco, so doch secundo loco seine Lehre von der fettigen Degeneration mit dem Studium der Krebszelle begründete. Aus diesen Untersuchungen ergibt sich in Analogie der *Hess*- und *Saxl*schen Anschauungen eine gewisse funktionelle Gleichheit der Tumor- und Embryonalzellen, freilich nicht in dem Sinne, daß beide nicht verfetten, wie es *Hess* und *Saxl* wollen, sondern daß im Gegenteil beide der Fettinfiltration zugängig sind.

[1] Merkwürdigerweise findet sich in der Arbeit von *Hess* und *Saxl* ein mit meinem Resultat übereinstimmender Passus: sie sagen, daß bei Embryonen von Kaninchen und Meerschweinchen nahe der Reife die Leber sich ungemein häufig als verfettet erwies.

Die partielle Hydrolyse des Populins zu Saligenin und Benzoylglucose durch ein Enzym der Taka-Diastase.

Von

Torao Kitasato.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 11. September 1927.)

Zu den Glucosiden, die aus mehr als 2 Bestandteilen bestehen, zählt das *Populin*, $C_{20}H_{22}O_8$. Es soll von Mandel-Emulsin nicht angegriffen werden[1]. Unter nicht definierten Bedingungen, bei Digestion der Substanz mit faulem Käse, soll eine Spaltung in Saligenin, Glucose und milchsaures Calcium stattfinden[1]; eine schwache hydrolysierende Kraft besitzt nach *E. Bourquelot* und *H. Hérissey*[2] das Emulsin aus Aspergillus niger, doch ist nicht festgestellt, welche Spaltungsprodukte es hervorbringt, da die Autoren nur auf den Eintritt von Reduktionsvermögen geachtet haben. Nun ist das Populin sicherlich ein Monobenzoyl-salicin, d. h. ein Benzoat des Saligenin-glucosids, $C_{13}H_{18}O_7$, also ein Vertreter der auch sonst in der Natur beobachteten benzoylierten Kohlenhydrate, zu denen Benzoate der Pentoside, ferner die Benzoylglucuronsäure sowie die Benzoyl-glucose selbst gehören. Bei der Zusammensetzung des Populins wäre es theoretisch möglich, daß der Benzoylrest an der freien Alkoholgruppe des Saligenins (o-Oxy-benzylalkohols) haften würde; denn Populin entsteht synthetisch durch Benzoylierung von Salicin (Saligenin-glucosid) = $C_6H_4 \begin{cases} \cdot CH_2OH \\ \cdot O \cdot C_6H_{11}O_5 \end{cases}$.
Da sich aber das Populin durch Oxydation in das Benzoat des Helicins oder Salicylaldehyd-glucosids $C_{13}H_{16}O_7 = C_6H_4 \begin{cases} \cdot COH \\ \cdot O \cdot C_6H_{11}O_5 \end{cases}$ überführen läßt und umgekehrt auch durch Reduktion des Benzoyl-helizins, das unzweifelhaft eine freie Aldehydgruppe enthält, gewinnen läßt, so

[1] Biochem. Handlexikon 2, 620, 1911.
[2] *E. Bourquelot* und *H. Hérissey*, C. r. 121, 693, 1895.

ergibt sich daraus, daß der Benzoesäure-rest im Populin nicht am Aglykon, sondern am Traubenzucker-radikal haftet.

Da, wie gesagt, bislang eine durchsichtige enzymatische Hydrolyse des Populins nicht bewerkstelligt war, die rein chemische Zerlegung mit verdünnten Säuren[1] aber zu Glucose, Benzoesäure und Saliretin, dem Verharzungsprodukt des Saligenins, geführt hat, während die alkalische Spaltung[2] mittels Barytwassers Benzoesäure und das Glucosid Salicin lieferte, so ist es bisher nicht möglich gewesen, etwas über die Verknüpfung des Zucker-restes mit der Benzoesäure zu erfahren.

Nach den Untersuchungen des hiesigen Instituts finden sich so viele hydrolysierende Enzyme in der Taka-Diastase vor; ich konnte nun feststellen, daß die *japanische Taka-Diastase ein Ferment enthält, das Populin unter Abspaltung von Saligenin zerlegt.* Die Ausbeute an Saligenin ist nahezu quantitativ; sie beträgt 96 % der theoretischen Möglichkeit. Als zweites Spaltungsprodukt des Populins entsteht dabei eine *Benzoyl-glucose*, die allem Anscheine nach verschieden von der bekannten, in der Natur vorkommenden Mono-benzoyl-glucose, dem Vacciniin = $C_6H_{11}O_6 . C_7H_5O$, ist. Es ist mir bisher wohl die Abscheidung des Saligenins in reiner Form gelungen, nicht aber die der Benzoyl-glucose. Der benzoylierte Zucker dürfte gegen das Fermentgemisch der Taka-Diastase nicht vollkommen resistent sein; stets trat nämlich auch ein Teil der Benzoesäure in freier Form auf. Es scheint demnach, daß in der Taka-Diastase ein auf Benzoylzucker eingestelltes Enzym vorkommt in ähnlicher Weise, wie hierin auch ein auf die Benzoyl-aminosäuren als wirksam erkanntes Ferment zugegen ist[3].

Zieht man die mit Taka-Diastase digerierte und dann filtrierte Lösung des Populins mit Äther aus, so nimmt dieser Saligenin und etwas freie Benzoesäure auf. Diese beiden Substanzen lassen sich dadurch trennen, daß man den Abdampfrückstand des Äthers in Wasser löst, mit Barytwasser versetzt und gleichzeitig Kohlendioxyd einleitet. Nach Filtration kann man nunmehr mit Äther reines Saligenin ausschütteln, während sich benzoesaures Barium in der wässerigen Lösung befindet.

In der mit Äther ursprünglich extrahierten wässerigen Flüssigkeit hinterbleibt die Mono-benzoyl-glucose. Verdampft man die Lösung in vacuo und nimmt abermals in Wasser auf, so kann man auch die letzten Reste des außerordentlich schwer löslichen, eventuell ungespaltenen gebliebenen Populins entfernen. Bei erneuter Konzentration der wässerigen Lösung und Extraktion mit 80 %igem Alkohol gewinnt man

---

[1] *E. O. v. Lippmann*, B. **12**, 1648, 1879.

[2] *Piria*, Ann. de Chim. et de Phys. (3) **34**, 280, 1852.

[3] *C. Neuberg* und *K. Linhardt*, diese Zeitschr. **147**, 372, 1924; *C. Hoppert*, ebendaselbst **149**, 510, 1924.

eine Lösung des Benzoylzuckers, die durch wiederholtes vorsichtiges Abdampfen zur Trockne und durch erneute Behandlung mit Alkohol von Bestandteilen des Fermentpräparats weitgehend befreit werden kann. Kristallisiert habe ich das Glucose-benzoat nicht darstellen können; denn es ist bei der beschriebenen Art der Isolierung immer noch von freier Glucose begleitet. Daß aber Glucose-benzoat darin enthalten ist, ergibt sich daraus, daß nach alkalischer oder saurer Verseifung vorher nicht im freien Zustande zugegen gewesene Benzoesäure losgelöst und isoliert werden kann. Auch der Versuch, durch Hefe den freien Zucker fortzuvergären und Benzoyl-glucose übrig zu behalten, führte bisher nicht zu einer reinen Substanz. Wohl gelingt es, den freien Zucker zu vergären und Benzoylglucose übrig zu lassen; denn es läßt sich zeigen, daß nach erfolgter Einwirkung von Hefe noch Benzoesäure in gebundener Form anwesend ist und aus dem Gemisch nur so viel Zucker vergoren wird, als vorhanden gewesener freier Glucose entspricht. Die Menge der, wie gesagt, nur in Lösung nachgewiesenen Benzoylglucose beträgt 45 % der Theorie.

Jedenfalls ist in der Taka-Diastase ein Ferment[1] enthalten, das Populin angreift und seine partielle Zerlegung in Saligenin und Benzoylglucose bewirkt. Diese beiden Verbindungen sind so zum ersten Male als Produkte einer gestuften enzymatischen Hydrolyse des Populins gewonnen.

Experimentelles.

5 g fein gepulvertes reines Populin (F. 178 bis 179°) wurden in einer Glasstöpselflasche mit 500 ccm Wasser, 10 g Taka-Diastase sowie 5 ccm Toluol vermischt und im Brutschrank bei 37° unter oftmaligem kräftigen Schütteln und Zerkleinerung sich zusammenballender Populinkörner aufbewahrt.

Als Kontrolle wurde eine 2 %ige Taka-Diastase-lösung, der 1 % Toluol zugegeben war, unter gleichen Bedingungen belassen.

Am nächsten Tage gab bereits eine Probe der Lösung die Eisenchlorid-Reaktion auf freies Saligenin; diese Reaktion wurde mit jedem Tage stärker, während sich der Populinniederschlag allmählich völlig auflöste. Gleichzeitig nahm das Reduktionsvermögen der Lösung zu, und nach 5 Tagen war das Maximum der Reduktion mit *Fehling*scher Lösung erreicht.

Die Flüssigkeit wurde nunmehr im Extraktionsapparat mit Äther ausgezogen, die ätherische Lösung sodann abgedampft, der Rückstand

[1] Versuche, andere, bisher enzymatisch nicht spaltbare Glucoside, z. B. auch das gegen Emulsin angeblich resistente Mono-benzoyl-helicin, mit Taka-ferment zu zerlegen, sollen gelegentlich im hiesigen Institut ausgeführt werden.



in Wasser aufgenommen und mit Barytwasser alkalisch gemacht. Darauf wurde Kohlendioxyd in die Lösung eingeleitet und die durch Filtration von Bariumcarbonat befreite Lösung wiederum mit Äther extrahiert. Der Abdampfrückstand des Äthers bestand aus Saligenin; es schmolz nach der Sublimation bei 85°. Ausbeute 1,4 g oder 96 % der Theorie. Die Mischprobe mit reinem Saligenin ergab keine Schmelzpunktserniedrigung.

Der wässerigen Lösung wurde nach Ansäuerung durch Salzsäure mit Äther Benzoesäure entzogen, die nach einmaliger Sublimation den Schmelzpunkt 121° aufwies. Ausbeute 0,6 g oder 42 % der theoretisch aus Populin abspaltbaren Menge.

Die ursprüngliche wässerige Lösung enthielt Glucose und Benzoylglucose; sie wurde nach der Filtration kurz aufgekocht, um eine weitere Einwirkung der Taka-Diastase zu verhindern. Nach dem Abdampfen in vacuo wurde der Rückstand mit 80 %igem Alkohol ausgezogen. Nach mehrmaligem Abdampfen und Extrahieren wurde der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und die filtrierte Lösung dann auf 100 ccm aufgefüllt (Lösung A).

Die Kontrolle (Taka-Diastase-lösung) wurde ganz ebenso behandelt (Lösung B).

1. 50 ccm der Lösung A wurden mit 2 %iger Schwefelsäure 6 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht. Dadurch wurde Benzoesäure abgespalten, von der nach Extraktion mit Äther 0,32 g oder 45 % der im Populin ursprünglich als Ester vorhandenen Quantität Benzoesäure erhalten wurden.

2. Von den beiden Lösungen A u. B wurden je 10,0 ccm mit je 0,5 g Unterhefe Patzenhofer im Eudiometer bei Zimmertemperatur vergoren.

An CO_2 (korrigiert nach der Kontrolle, in der etwas dem Fermentpräparat entstammender Zucker vorhanden war) wurden 24,0 bzw. 28,0 ccm gefunden.

Diese Mengen CO_2 entsprechen 0,0976 bzw. 1,138 g Glucose oder 46 % bzw. 54% der im Populin steckenden Zuckermenge.

Die aus 5 g Populin in der beschriebenen Weise gewonnene und vergorene Lösung wurde filtriert, kurz aufgekocht, im Vakuum eingeengt und mit 80 %igem Alkohol extrahiert. Nach dem Abdampfen des Alkohols hinterblieb ein Sirup, der an Äther keine Substanz abgab. Der Sirup löste sich leicht in Wasser, verdünntem Alkohol, aber nicht in Äther, auch nicht in Aceton und Essigäther. Eine Probe entwickelte nach Zusatz von alkoholischer Kalilauge sofort den Geruch des Benzoesäure-äthyl-esters. Die Substanz reduzierte auch *Fehling*sche Mischung stark.

$^1/_{10}$ der wässerigen Lösung dieses Sirups, also = 10,0 ccm, wurden mit der gleichen Menge n NaOH versetzt und in der Kälte stehengelassen. Nach einem Tage wurde die Flüssigkeit mit Salzsäure angesäuert und mit Äther extrahiert; in diesen gingen 0,065 g Benzoesäure oder 45 % der möglichen Menge über. Die wässerige Lösung lieferte mit essigsaurem Phenylhydrazin d-Glucosazon vom Schmelzpunkt 202 bis 204°.

25 ccm der Lösung jenes Sirups, die mit der gleichen Menge n/10 NaOH gemischt worden war, spaltete nach einem Tage mit der schwächeren Lauge nur 0,0125 g = 0,05 % der Benzoesäure ab. Dann wurde mit Salzsäure genau neutralisiert und mit Hefe vergoren; dabei entwickelten sich 3,5 ccm CO_2 (korrigiert), die 0,0569 g Glucose in 100 ccm anzeigen. Die der frei gewordenen Benzoesäure entsprechende Menge Glucose sollte für die gesamte Lösung (= 100 ccm) 0,0746 g ausmachen. Also betrug die durch Verseifung frei gemachte Menge Traubenzucker 76 % der aus dem Benzoat-wert berechneten Quantität.

Die Hydrolyse der Proteine durch Säuren und Alkalien.

Von

J. S. Jaitschnikow.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Laboratorium der I. Moskauer Staatsuniversität und aus dem Analytischen Laboratorium der Pädagogischen Fakultät der II. Moskauer Staatsuniversität.)

(Eingegangen am 12. September 1927.)

Das Molekül der Proteine ist eins der kompliziertesten; dafür spricht das hohe Molekulargewicht, die kolloidale Natur der Proteine und die große Zahl der Abbauprodukte (Aminosäuren). Die Kompliziertheit des Proteinmoleküls bietet erhebliche Schwierigkeit sowohl für die Erkenntnis seiner Struktur, als auch bei den Untersuchungen seiner Spaltung, besonders vom Standpunkt der Kinetik

Anzuerkennen ist die Kompliziertheit der Proteinmoleküle, es muß jedoch bemerkt werden, daß diese Tatsache im hohen Grade übertrieben oder nicht ganz richtig erläutert wird.

Die Kompliziertheit des Proteinmoleküls kann durch Polymerisation der einfacheren chemischen Verbindungen erklärt werden. Sie wird noch durch Aschebestandteile, durch Salzbildung usw. vermehrt. Aber das Hauptglied des Proteinmoleküls ist wahrscheinlich nicht so kompliziert, wie man es gewöhnlich meint.

In den Versuchen, die weiter angeführt werden, wurde erprobt, an Untersuchungen der *Säure- und Alkalihydrolyse der Proteine vom Standpunkt der Kinetik* zu zeigen, daß die Spaltung der Proteine bei erster Annäherung den einfachen Gesetzmäßigkeiten unterworfen ist, so wie die Spaltung seiner Abbauprodukte, der Peptide. Es ist gleichgültig, ob wir hier die klassische Theorie der Polypeptidstruktur des Proteinmoleküls (*E Fischer*) oder die neueren Ansichten von *N. D. Zelinsky* und *W. S. Ssadikow* und *E. Abderhalden* annehmen, da die Diketopiperazinspaltung auch den einfachen Gesetzmäßigkeiten unterworfen ist.

In unseren Versuchen wurde die Säure- bzw. Alkali-Spaltung oder die Spaltung mit der einen und mit der anderen bei verschiedenen Temperaturen und Konzentrationen ausgeführt. Folgende Stoffe wurden untersucht: 2, 5-Diketopiperazin, Glycyl-glycin, Pepton und Proteine (Albumine, Casein, Edestin, Glutin, Elastin, Keratin und Seide).

Die Spaltung des 2, 5-Diketopiperazins und der Dipeptide ist monomolekular. Für die Peptone und Proteine ist die einfache Formel von *Schütz-Borisoff*, $K = \frac{x}{\sqrt{t}}$, gültig ($K =$ Konstante, $x =$ die Menge des gespaltenen Proteins, $t =$ Dauer). Bei enzymatischer Proteinspaltung wird das Prinzip von *Schütz-Borisoff* auch häufig beobachtet. Wir glauben, daß diesem analog die Anwendbarkeit dieser Formel auch bei der Säure- bzw. Alkalihydrolyse auf die Säure- und Alkalibindung durch Proteine, auf eine Bildung der nichtbeständigen Zwischenverbindungen mit Säure oder Alkali weist. Unsere Versuche der Proteinspaltung durch n/5 Säuren und Alkalien bestätigen diese Vermutung. Die Bildung der salzartigen Verbindungen mit Säuren und Alkalien verursacht die Abweichung von der einfachen monomolekularen Formel zu der nicht minder einfachen Formel von *Schütz-Borisoff*.

Es ist schwer, sich vorzustellen, daß das sehr komplizierte Molekül durch Enzyme, Säuren und Alkalien nach einer so einfachen Gesetzmäßigkeit gespalten wird. Man kann vermuten, daß ein kompliziertes Polymeres zu Beginn der Hydrolyse in Monomere gespalten wird unter Bildung der Zwischenverbindungen mit Säuren oder Alkalien, und dann wird dieses einfache Monomere weiter gespalten. Das ist einer der Fälle, wenn die erwartete Reaktion der hohen Ordnung zu einer Reaktion der niedrigen Ordnung entschieden aufgelöst wird.

Experimenteller Teil.

1. Die Spaltung des 2, 5-Diketopiperazins.

Eine n/10 Diketopiperazinlösung in n/5 Salzsäure wurde bei 10° im Laufe von 14 Tagen hydrolysiert. Von Zeit zu Zeit wurden Proben entnommen, die, mit n/5 Natronlauge neutralisiert, nach *Sörensen* titriert wurden. Es wurde erhalten, auf 1 ccm der Diketopiperazinlösung berechnet:

0	1	3	5	8	10	14 Tage
0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4 ccm n/5 NaOH.

In einem anderen Versuch wurde die Hydrolyse bei 100° im Laufe von 20 Stunden ausgeführt.

0	½	1	2	3	5	7	9	11	13
0,02	0,4	0,48	0,54	0,55	0,55	0,6	0,69	0,68	0,68

15	17	20 Stunden
0,68	0,68	0,68 ccm n/5 NaOH.

Im dritten Versuch wurde das Diketopiperazin durch n/5 Natronlauge bei 10° im Laufe von 10 Tagen hydrolysiert. Die mit n/5 Salzsäure neutralysierten Proben wurden nach *Sörensen* titriert. Es wurde erhalten, auf 1 ccm der Diketopiperazinlösung berechnet:

0	2	6	24 Stunden
0	0,3	0,5	0,65 ccm n/5 NaOH;

2	3	5	7	10 Tagen
0,75	0,8	0,8	0,8	0,8 ccm n/5 NaOH.

Auf diese Weise wurden bei der Säurehydrolyse bei 10° 40%, bei 100° 68%, bei Alkalihydrolyse 80% des Diketopiperazins gespalten; weiter ging die Spaltung nicht vor sich. Am Ende des Versuchs war das Diketopiperazin nicht mehr nachzuweisen (die Reaktion mit Pikrinsäure und Soda war negativ); daraus folgt, daß das Diketopiperazin bis zum Peptid (Glycyl-glycin) vollkommen gespalten wird, die weitere Spaltung bis zu Aminosäuren ist aber keine vollständige.

Es muß bemerkt werden, daß die Spaltung mit Laugen viel schneller als mit Säuren vor sich geht. Die Reaktionsordnung habe ich nicht bestimmt; *Lüdtke*[1] hat gezeigt, daß die Reaktion erster Ordnung ist.

2. *Die Spaltung des Glycyl-glycins*[2].

Glycyl-glycin wurde durch n/5 Salzsäure gespalten; die Konzentration des Peptids war n/10, die Temperatur — 10°; die Geschwindigkeit der Hydrolyse wurde durch Formoltitrierung nach *Sörensen* kontrolliert. Hierzu dienten Proben von je 10 ccm, die vor der Titrierung mit n/5 Natronlauge neutralisiert wurden. Es wurden folgende Resultate erhalten.

Dauer, t Tage	% der Spaltung, x	% des Ungespaltenen $(a - x)$	$K = \frac{1}{t} \log_{10} \frac{a}{a-x}$
0	0	100,00	—
3	5,88	94,12	0,008 77
7	12,74	87,26	0,008 45
10	17,65	82,35	0,008 43
11	19,61	80,39	0,008 62
15	21,57	78,43	0,007 04

$a = 100{,}0\,\%$

In einem anderen Versuch wurde die Hydrolyse bei 100° ausgeführt; es wurden Proben zu je 5 ccm entnommen; sie wurden neutralisiert und wie oben titriert.

Dauer, t Std	% der Spaltung, x	$K = \frac{1}{t} \log_{10} \frac{a}{a-x}$
0	0	—
1	4,0	0,017 73
2	8,0	0,018 11
3	12,0	0,018 51
5	20,0	0,019 38
8	40,0	0,027 73
12	68,0	0,041 24
15	100,0	

$a = 100{,}0\,\%$

Die Reaktion war in beiden Fällen nahezu monomolekular. Die Spaltung des Glycyl-glycins durch Natronlauge wurde folgendermaßen ausgeführt. Eine n/20 Glycyl-glycinlösung in n/5 NaOH wurde bei 100° hydrolysiert und das abgespaltene Glykokoll nach *Sörensen* titriert. Dazu dienten Proben von je 5 ccm, die mit n/5 Salzsäure neutralisiert wurden. Es wurden folgende Daten erhalten:

[1] Hoppe-Seyler **141**, 100, 1924.

[2] Ber. **56**, 2226.



Dauer, t Std.	% der Spaltung, x	$K = \frac{1}{t} \log_{10} \frac{a}{a-x}$
0	—	—
1	44,0	0,251 81
2	60,0	0,198 97
3	76,0	0,206 60
5	100,0	—
7	100,0	—

$a = 100{,}0\,\%$

In einem anderen Versuch war die Konzentration des Glycyl-glycins n/10; alle übrigen Bedingungen stimmten mit denjenigen des vorstehenden Versuchs überein.

Dauer, t Std.	% der Spaltung, x	$K = \frac{1}{t} \log_{10} \frac{a}{a-x}$
0	—	—
1	8,0	0,036 21
2	18,0	0,043 10
3	26,0	0,043 59
5	40,0	0,044 37
7	46,0	0,038 23

$a = 100{,}0\,\%$

Die Spaltung durch Alkali geht schneller als mit Säure vor sich und ist nahezu monomolekular.

3. *Die Hydrolyse des Peptons.*

Eine 1%ige Lösung des Peptons wurde durch n Natronlauge bei 10, 37, 70 und 100° hydrolysiert; die Proben (5 ccm) wurden mit n Salzsäure neutralisiert und nach *Sörensen* titriert; die erhaltenen Daten wurden auf 1 ccm der Peptonlösung berechnet.

Temperatur	Dauer, t	Bei der Titrierung gebrauchte n/5 NaOH in ccm auf 1 ccm berechnet (x)	$K_S = \frac{x}{\sqrt{t}}$
10°	2 Tage	0,03	0,021
	4 „	0,06	0,030
	9 „	0,08	0,027
	16 „	0,12	0,030
	25 „	0,13	0,026
37	1 Stunden	0,02	0,020
	4 „	0,08	0,040
	9 „	0,13	0,043
70	1 „	0,04	0,040
	4 „	0,10	0,050
	9 „	0,16	0,053
100	1 „	0,07	0,070
	4 „	0,17	0,085
	9 „	0,26	0,087

Die Spaltung der Peptone geht somit nach der Regel von *Schütz-Borisoff* vor sich.

4. *Die Hydrolyse der Proteine.*

Die 1%igen Proteinlösungen in n Säuren oder n Laugen wurden bei verschiedenen Temperaturen hydrolysiert. Die Proben (5 ccm) wurden mit n Lauge bzw. n Säure neutralisiert und mit n/5 Natronlauge nach *Sörensen* titriert. Die erhaltenen Daten wurden auf 1 ccm der Lösung berechnet. Die Resultate sind in der Tabelle zusammengefaßt.

Das Protein	Die Säure oder Lauge	Temperatur	Dauer Std.	Bei der Titrierung verbrauchte n/5 NaOH auf 1 ccm der Lösung berechnet (x)	$K_S = \frac{x}{\sqrt{t}}$
Albumin . .	HCl	37°	1	0,02	0,020
			2	0,10	0,071
			4	0,14	0,070
			6	0,18	0,073
			9	0,24	0,080
			11	0,28	0,084
" . .	NaOH	37	1	0	—
			4	0,04	0,020
			9	0,08	0,027
			12	0,10	0,029
" . .	"	70	1	0,06	0,060
			4	0,10	0,050
			9	0,13	0,043
" . .	"	100	1	0,10	0,100
			4	0,16	0,080
			9	0,20	0,067

Das Protein	Die Säure oder Lauge	Temp.	Std.	x	$K_S = \frac{x}{\sqrt{t}}$	N mg $= 2{,}8x = x'$	$K_1 = \frac{1}{t} \log_{10} \frac{a}{a - x'}$
Casein. .	NaOH	37°	1	0,06	0,060		
			4	0,08	0,040		
			9	0,12	0,040		
			12	0,14	0,040		
" . .	"	70	1	0,06	0,060		
			4	0,08	0,040		
			9	0,14	0,047		
			12	0,16	0,046		
" . .	"	100	1	0,14	0,140		
			4	0,16	0,080		
			9	0,18	0,060		
Edestin .	HCl	37	1	0,04	0,040	0,112	0,027 12
			2	0,06	0,043	0,168	0,020 67
			4	0,12	0,060	0,336	0,021 76
			6	0,20	0,082	0,560	0,026 10
			8	0,18	0,064	0,504	0,017 26
"	"	70	1	0,08	0,080	0,224	0,056 05
			2	0,10	0,071	0,280	0,035 64
			4	0,16	0,080	0,448	0,030 11
			6	0,24	0,098	0,672	0,032 67
"	"	100	1	0,10	0,100	0,280	0,071 27
			2	0,22	0,156	0,616	0,087 93
			4	0,66	0,330	1,848	0,741 54

$a = 1{,}85$ mg N

In diesen Versuchen gilt die *Schütz-Borisoff*sche Regel. Für Edestin ist auch die Reaktion erster Ordnung mehr oder weniger passend; bei der Berechnung der Konstante nach der Formel

$$K = \frac{1}{t} \lg_{10} \frac{a}{a - x'}$$

wurde für a die N-Menge in Milligrammen in 1 ccm der 1 %igen Lösung genommen. Bei Stickstoffgehalt des Edestins von 18,5 % $a = 1{,}85$ mg; x' wurde durch Multiplikation von x mit 2,8 gefunden, daß 1 ccm n/5 NaOH 2,8 mg N entspricht.

In anderen Versuchen wurde die Spaltung der 1 %igen Proteinlösungen durch n/5 Säure oder Lauge bei verschiedenen Temperaturen ausgeführt; die Proben (5 ccm) mit n/5 Lauge bzw. Säure neutralisiert und mit n/5 NaOH nach *Sörensen* titriert; es wurde auf 1 ccm der Lösung berechnet. In diesen Versuchen wurde auch die Menge der für die Neutralisation des Hydrolysats verbrauchten n/5 Säure oder Lauge festgestellt. Die Resultate werden in folgenden Tabellen zusammengefaßt (n ccm der zum Neutralisieren von 1 ccm der Lösung verbrauchten n/5 Säure oder Lauge, x ccm der n/5 NaOH, die für die Formoltitrierung verbraucht wurden; t Dauer in Stunden).

Das Protein	Die Säure oder Lauge	Temperatur	t	n	x	$K_S = -\frac{x}{\sqrt{t}}$
Glutin . . .	HCl	100°	0	1,0	0	—
			1	1,05	0,08	0,080
			4	1,02	0,14	0,070 }
			9	1,02	0,2	0,067 }
„ . . .	NaOH	37	0	0,92	0	—
			1	0,88	0,04	0,040
			4	0,82	0,06	0,030 }
			9	0,82	0,08	0,027 }
			16	0,82	0,1	0,025 }
„ . . .	„	100	1	0,77	0,13	0,130
			4	0,7	0,22	0,110
			9	0,61	0,24	0,080
Casein . . .	HCl	70	0	0,96	0	—
			1	0,92	0	—
			4	0,94	0,01	0,005
			9	0,94	0,02	0,007
			12	0,96	0,04	0,011
„ . . .	„	100	0	0,96	0	—
			1	0,95	0,03	0,030 }
			4	1,00	0,05	0,025 }
			9	1,07	0,07	0,023 }

Das Protein	Die Säure oder Lauge	Temperatur	t	n	x	$K_S = \frac{x}{\sqrt{t}}$
Casein . . .	Na OH	37°	0	0,92	0	—
			1	0,89	0,02	0,020
			4	0,88	0,04	0,020
			9	0,84	0,07	0,023
			12	0,78	0,08	0,023
„ . . .	„	70	0	0,92	0	—
			1	0,87	0,03	0,030
			4	0,82	0,05	0,025
			9	0,85	0,09	0,030
			12	0,81	0,10	0,028
„ . . .	„	100	0	0,92	0	—
			1	0,82	0,04	0,040
			4	0,76	0,07	0,035
			9	0,84	0,12	0,040
Keratin . .	H Cl	100	1	1,0	0,04	0,040
			4	1,06	0,07	0,035
			9	1,13	0,12	0,040
„ . .	Na OH	37	0	0,87	0	—
			1	0,81	0,04	0,040
			4	0,8	0,04	0,020
			9	0,78	0,05	0,017
			12	0,77	0,07	0,020
„ . .	„	70	1	0,78	0,05	0,050
			4	0,77	0,06	0,030
			9	0,75	0,08	0,027
			12	0,72	0,09	0,026
„ . .	„	100	1	0,72	0,05	0,050
			4	0,7	0,07	0,035
			9	0,65	0,13	0,043
Seide . . .	H Cl	70	0	0,9	0	—
			1	0,92	0,01	0,010
			4	0,93	0,02	0,010
			8	0,98	0,06	0,022
			12	0,96	0,08	0,023
„ . . .	„	100	0	0,9	0	—
			1	0,94	0,02	0,020
			4	1,0	0,05	0,025
			8	1,17	0,13	0,047
„ . . .	Na OH	70	0	0,96	0	—
			1	0,9	0,03	0,030
			4	0,87	0,05	0,025
			9	0,83	0,09	0,030
„ . . .	„	100	0	0,96	0	—
			1	0,85	0,10	0,100
			4	0,8	0,18	0,090
			9	0,74	0,21	0,070

Das Protein	Die Säure oder Lauge	Temp.	t	n	x	$K_S = \frac{x}{\sqrt{t}}$	N mg = 2,8 x = x'	$K_1 = \frac{1}{t} \lg_{10} \frac{a}{a-x'}$
Elastin	HCl	100°	0	1,1	0	—	0	—
			1	0,98	0,02	0,020	0,056	0,015 34
			4	—	0,04	0,020	0,112	0,007 81
			9	—	0,06	0,020	0,168	0,005 31
			12¼	—	0,14	0,040	0,392	0,009 87
„	NaOH	100	0	1,0	0	—	0	—
			1	0,95	0,15	0,150	0,420	0,130 99
			2¼	0,9	0,15	0,100	0,420	0,058 22
			4	0,87	0,2	0,100	0,560	0,046 30
			6¼	0,87	0,3	0,120	0,840	0,051 11
			9	0,85	0,33	0,110	0,924	0,041 04

$a = 1,613.$

Auch in diesen Versuchen geht die Spaltung mit n/5 Laugen schneller als mit n/5 Säuren vor sich, wie es schon bei Glycyl-glycin und Diketopiperazin bemerkt wurde, doch langsamer, als mit n Lauge und n Säure.

In der Mehrzahl der Fälle wurde die Formel $K = \frac{x}{\sqrt{t}}$ bestätigt. Für Elastin bei 100° ist auch die Reaktion erster Ordnung bis zu einem gewissen Grade anwendbar $\left(K = \frac{1}{t} \lg_{10} \frac{x}{a - x'}\right)$; bei dem Stickstoffgehalt von 16,13% $a = 1,61$ mg; $x' = 2,8\,x$.

In den Tabellen lenkt die Spalte n die Aufmerksamkeit auf sich (Kubikzentimeter der n/5 Säure bzw. Lauge, die für das Neutralisieren des alkalischen bzw. sauren Hydrolysats verbraucht wurden). Im Falle der Säurehydrolyse nimmt n am Anfang ab; dies besagt, daß am Anfang der Hydrolyse die Säure durch Proteine gebunden wird. Bei der Alkalihydrolyse wird n nicht nur am Anfang (Bindung von Alkali durch Proteine), sondern auch weiter beobachtet; dieses kann man dadurch erklären, daß die entstehenden sauren Abbauprodukte Alkalilauge binden und ihren Titer vermindern.

Über die Reinigung des Chymosins.

Von

H. Lüers und J. Bader.

(Aus dem Laboratorium für angewandte Chemie der Technischen Hochschule München.)

(Eingegangen am 13. September 1927.)

In einer früheren Veröffentlichung berichteten *H. Lüers* und *A. Diem*[1] über Versuche, welche zum Ziele hatten, das Labenzym nach den in der neueren präparativen Enzymchemie bewährten Methoden in reineren Zustand überzuführen. Es wurde dabei von einem flüssigen käuflichen Labpräparat ausgegangen, das eine Labungsstärke von etwa 1 : 20000 hatte (d. h. 1 g Lab bringt unter normierten Bedingungen 20000 g Milch zur Gerinnung), und auf dem Wege einer Reihe aufeinanderfolgender Adsorptionen und Elutionen eine Enzymlösung erhalten, deren Labungsstärke 1 : 7 Millionen betrug. Der Stickstoffgehalt wurde dabei von etwa 70% Protein in der Ausgangslösung auf 6% in der gereinigten Enzymlösung herabgedrückt.

Die vorliegende Arbeit bezweckte, den von *Lüers* und *Diem* erreichten Reinheitsgrad des Labenzyms noch zu verbessern. Da es wenig aussichtsreich erschien, auf dem Wege weiter fortgesetzter Adsorptionen und Elutionen wesentlich mehr noch zu erreichen, sollte vor allem versucht werden, aus dem Kälbermagen selbst bereits einen reineren Enzymauszug zu gewinnen, als er in den käuflichen Labessenzen zugänglich ist. An diesem Material sollten dann verschiedene Methoden der Vorreinigung versucht werden, worauf sich dann erst die Adsorption und Elution anzuschließen hatte.

Experimentelles.

Die Labbestimmungsmethode.

Zur Bestimmung der Wirksamkeit des Chymosins wurde die von *Lüers* und *Diem* (l. c.) ausgearbeitete viskosimetrische Methode verwendet. Wegen Einzelheiten sei auf die zitierte Arbeit verwiesen. Als Meßinstrument diente ein *Ostwald*sches Durchflußviskosimeter, dessen

---

[1] Zeitschr. f. Milchkunde u. Milchwirtschaft 2, 405, 1925.

Wasserwert bei einer Füllung von 16 ccm und der Temperatur 35^0, bei der alle Labungen durchgeführt wurden, genau $^{100}/_5$ Sekunden betrug. Zur Labung wurde Trockenmilch von der Milchwerk G. m. b. H. Kempten, hergestellt nach dem *Krause*-Verfahren im Werk *Schlachters*, verwendet. Je 5 g dieser Milch werden mit 25 ccm Wasser homogen verrührt, bis zum Beginn des Kochens erhitzt und durch ein Stuhltuch filtriert. 10 ccm der Milch werden in das Viskosimeter gegeben und nach Temperierung auf 35^0 so viel Enzymlösung bzw. Wasser[1] zugesetzt, bis das Volumen von 16 ccm erreicht ist, worauf durch kurzes Durchblasen gemischt wird. In Abständen von 2 Minuten wird mit der Stoppuhr dann die Durchflußzeit ermittelt. Anfänglich nimmt die Viskosität infolge der Desaggregation der Caseinmicelle ab, um dann mit fortschreitender Gerinnung rasch anzusteigen. Jeder Versuch wird graphisch ausgewertet, indem auf der Abszisse die Ablesungszeiten, auf der Ordinate die Durchflußzeiten in $^1/_5$ Sekunden aufgetragen werden und damit die Labungskurve erhalten wird. Zur weiteren Auswertung wird aus der Kurve die zu einer willkürlich gewählten Viskosität von $^{200}/_5$ Sekunden gehörende Gerinnungszeit ermittelt und ihr reziproker Wert $= K$ gesetzt. Nachdem *Lüers* und *Diem* (l. c.) nachgewiesen haben, daß Gerinnungsgeschwindigkeit und Labkonzentration umgekehrt proportional sind, bilden die K-Werte ein unmittelbares Maß der Enzymkonzentration.

Um den Reinheitsgrad des Enzymmaterials zum Ausdruck zu bringen, bilden wir den Quotienten: $\frac{K}{\text{Salzfreie Trockensubstanz}}$, wobei beide Größen natürlich auf Lösungen gleicher Konzentration zu beziehen sind. Bei den oft sehr niederen Konzentrationen der Enzymlösungen an anorganischer Substanz ist besondere Sorgfalt auf eine exakte Bestimmung des anorganischen Salzgehaltes zu legen. Bei Verwendung von Natriumchlorid in den Digestionslösungen läßt sich der Salzgehalt titrimetrisch sicher ermitteln, bei Verwendung von Phosphatlösungen (z. B. Elutionen) wurde die anorganische P_2O_5 nach *v. Lorenz* ermittelt und daraus der wasserfreie Phosphatgehalt berechnet (s. *Lüers* und *Diem*, l. c.). Schwierigkeiten machte die Trockensubstanzbestimmung im Falle der Verwendung von Na-Acetat als Digestionsmittel. In diesem Falle hielten wir es für zweckmäßiger, zur Charakterisierung des Reinheitsgrades den Quotienten $\frac{K}{\text{Stickstoffgehalt der Enzymlösung}}$ zu verwenden.

---

[1] Gewöhnlich wurde 1 ccm der unverdünnten oder 1 : 10 verdünnten Lösung verwendet, nur bei enzymarmen Lösungen wurden bis 5 ccm zugesetzt.

Ermittlung der günstigsten Extraktionsbedingungen des Enzyms.

Die uns zur Verfügung stehende Lablösung hatte folgende Eigenschaften:

Versuch	$K_{1:100}$	Trockensubst. in 20 ccm unverd. Lösung g	Kochsalzfreie Trockensubst. in 20 ccm Lösung g	N in 20 ccm Lösung mg	Reinheitsgrad $\frac{K_{1:10}}{\text{Trockensubst.}_{1:10}}$
1	0,0625	8,0737	4,966	143,19	$\frac{0,625}{0,4966} = 1,258$

Nachdem der Reinheitsgrad dieser Lablösung sehr wenig befriedigte, wurde nach verschiedenen Methoden versucht, aus fein zerkleinertem, getrocknetem Kälbermagen eine reinere Enzymlösung zu gewinnen. Es wurde jeweils 1 g des Magens mit 50 ccm Lösungsmittel 12 Stunden unter Chloroformzusatz im Eisschrank extrahiert und über ein gewöhnliches Faltenfilter filtriert. Der reine Wasserauszug gab folgende Werte:

Versuch	$K_{1:10}$	Salzfreie Trockensubstanz g	N mg	Reinheitsgrad
2	0,0653	0,0838	27,126	$\frac{0,0653}{0,008\,38} = 7,79$

In den folgenden Versuchen wurden die Angaben *Hammarstens*[1] nachgeprüft: Der Magen wurde mit 0,1- und 0,2 %iger Salzsäure extrahiert und das Filtrat genau mit Natronlauge neutralisiert. Dabei scheidet sich eine hyaline Fällung ab, die nach 24 Stunden abzentrifugiert und soweit als möglich in Wasser gelöst wird. Das Filtrat und die wiedergelöste Fällung werden analysiert:

Enzymlösung		Versuch	K	Salzfreie Trockensubstanz g	N mg	Reinheitsgrad
0,1 %ige HCl	Filtrat	3	0,128 2 (1 : 10)	0,2085	33,112	6,148
	gelöste Fällung	4	0,116 27 (unverd.)	0,0104	17,14	11,18
0,2 %ige HCl	Filtrat	5	0,147 05 (1 : 10)	0,1136	31,416	12,93
	gelöste Fällung	6	0,084 67 (unverd.)	0,0098	17,85	8,64

Versuche, die hyaline Fällung in 0,2 %iger HCl zu lösen und durch Halbsättigung mit Kochsalz oder Ammonsulfat wieder zu fällen, führten

[1] Zeitschr. f. phys. Chem. **56**, 23 bis 53; **94**, 104; **74**, 142; **102**, 33; **108**, 243; **121**, 240.

zu keinen greifbaren Resultaten hinsichtlich Enzymausbeute und Enzymreinheit.

Nachdem es *Lüers* und *Diem* gelungen war, mittels Phosphatpuffern aus den Aluminiumadsorbaten reine Enzymlösungen zu erzielen, sollte versucht werden, auf diesem Wege aus dem Magen selbst das Enzym zu extrahieren. Als Extraktionslösungen kamen m/15 Phosphatpuffer zur Verwendung:

p_H des Phosphatpuffers	Versuch	$K_{1:10}$	Phosphatfreie Trockensubstanz g	N mg	Reinheitsgrad
4,5	9	0,0505	0,0773	24,27	6,533
6,25	10	0,0909	0,0893	26,41	10,18
6,46	11	0,1215	0,0843	27,26	14,13
6,97	12	0,1031	0,0876	29,97	11,77
9,18	13	0,0699	0,0878	26,41	7,96

In methodischer Beziehung ist hier zu erwähnen, daß die Enzymlösungen, bevor sie der Milch zur Labungsbestimmung zugegeben wurden, auf kolorimetrischem Wege durch Säure oder Lauge jeweils auf das p_H der Milch (6,4) eingestellt wurden.

Aus den Versuchen läßt sich ersehen, daß eine Extraktion des Labmagens mit Phosphatpuffer von p_H 6,46 bereits zu einer bemerkenswert reinen Enzymlösung führt. Von Interesse ist auch die Feststellung, daß Reinheitsgrad und Stickstoffgehalt der Auszüge fast parallel gehen, was man besonders bei graphischer Darstellung, auf die verzichtet wird, erkennen kann.

Eine weitere Versuchsserie sollte den Wert des in der Praxis der Labbereitung viel verwendeten Chlornatriums als Extraktionsmittel beleuchten. Die Ergebnisse zeigt folgende Tabelle:

	Lösungsmittel	Versuch	$K_{1:10}$	Salzfreie Trockensubstanz g	N mg	Reinheitsgrad
12 Std. im Eisschrank	50 ccm 10%ige NaCl-Lösung	14	0,1538	0,1984	31,4	7,756
	50 „ 5%ige „	15	0,1589	0,0871	25,7	15,94
	40 „ 10%iges NaCl + 10 ccm Alkohol	16	0,1234	0,1180	18,5	10,45
	40 ccm 5%iges NaCl + 10 ccm Alkohol	17	0,125	0,0959	19,3	13,04
	5%ige NaCl-Lösung 96 Std. bei 25°	18	0,1905	0,1158	20,7	16,57

Das beste Ergebnis hatte also der letzte Versuch (18) gezeigt, bei welchem der Magen einer Selbstverdauung unterworfen wurde.

Es lag nahe, durch künstlich gesteigerte Verdauung des Magens unter der Einwirkung proteolytischer Enzyme, und zwar des Pankreatins ($p_H = 7,17$) des Papains ($p_H = 5,0$) und des Pepsins ($p_H = 4,0$, ein niedrigeres p_H verträgt das Lab nicht) zu noch höheren Enzymausbeuten zu gelangen, jedoch bewies der Versuch das Gegenteil. Beim Pepsinversuch war der Reinheitsgrad $\frac{0,1247}{0,02564} = 4,86$ und beim Papainversuch $\frac{0,0283}{0,0396} = 0,715$, während beim Pankreatinversuch überhaupt keine Labung mehr eintrat.

Da später eine Vorreinigung des Enzyms durch Fällen mit Bleiacetat versucht werden sollte, wobei Chloride hinderlich sind, wurden noch einige Extraktionen mit Na-Acetat angesetzt. Da durch die Sommerferien zwischen diesen und den letzten Versuchen mehrere Monate lagen, während welchen Milch und Magen gealtert waren, wurde, um den Anschluß zu gewinnen, der Versuch 18 nochmals wiederholt.

Lösung	Versuch	$K_{1:10}$	Salzfreie Trockensubstanz g	N mg	Reinheitsgrad
5%ige Na Cl-Lösung 96ʰ bei 25° C	19	0,0739	0,0904	12,719	8,175
5%iges Na Acetat 12ʰ bei 5° C .	22	0,0862	0,1164	13,657	7,40
5%iges „ 96ʰ „ 25° C	23	0,1280	0,1091	16,32	11,74
5%iges „ (40 ccm) + 10 ccm Alkohol 12ʰ bei 5° C .	24	0,0505	0,0521	9,23	9,44
5%iges Na-Acetat (40 ccm) + 10 ccm Alkohol 96ʰ bei 25° C .	Es trat keine Labung mehr ein.				

Demnach hatte von allen Versuchen das günstigste Ergebnis eine Selbstverdauung des Magens mit 5%iger Na-Acetatlösung ergeben. Es sollte deshalb diese Enzymlösung als Ausgangsmaterial für die weiteren Versuche dienen.

Vorreinigung des Enzyms.

Zunächst wurde versucht, die Eiweißstoffe der Enzymlösung mit Bleiacetat zu fällen. Da aber Bleiacetat schon in sehr geringer Menge selbst Gerinnung der Milch verursacht, mußte es peinlich aus den Lösungen entfernt werden. Die Enzymlösung wurde mit Bleiacetat im Überschuß gefällt und das Filtrat durch H_2S vom Blei befreit. Der Schwefelwasserstoff wurde mit CO_2 vertrieben. Die aus 50 ccm Lösung stammende Bleifällung wurde in 50 ccm Wasser suspendiert, mit H_2S zerlegt, filtriert und ebenfalls das H_2S mit CO_2 ausgetrieben.

Enzymlösung	Versuch	$K_{unverd.}$	Salzfreie Trockensubstanz g	N mg	Reinheitsgrad
Filtrat der Bleifällung . .	25	0,0654	0,0652	16,41	1,00
Zerlegte Bleifällung . . .	26	0,0609	0,0132	6,43	3,66

Die Resultate sind ungünstig und lassen sich wohl auf eine Schädigung des Enzyms durch Schwefelwasserstoff zurückführen. Die Bleieiweißfällung wurde deshalb mit einem Phosphatpuffergemisch von p_H 6,97 30 Minuten unter Eiskühlung eluiert:

	Versuch	$K_{1:10}$	Phosphatfreie Trockensubstanz g	N mg	Reinheitsgrad
Phosphatelution . .	27	0,0433	0,0485	11,79	8,79

Da auch dieser Versuch noch kein befriedigendes Resultat lieferte, wurde nur mit so viel Bleiacetat gefällt, daß im Filtrat kein Überschuß daran vorhanden war. Das Filtrat sowie die Phosphatelution der Fällung wurden untersucht:

	Versuch	K	Salzfreie Trockensubstanz g	N mg	Reinheitsgrad
Filtrat	28	0,10 (1 : 10)	0,1350	14,79	7,4
Elution	29	0,0291 unverd.	0,0371	3,4	7,84

Das Ergebnis war also auch sehr wenig befriedigend.

Bei den folgenden Versuchen wurde anstatt der salzfreien Trockensubstanz zur Reinheitsgradermittlung der Stickstoffgehalt in Rechnung gesetzt, da der Acetatgehalt nur rechnerisch ermittelt werden konnte und damit mit erheblichen Unsicherheiten belastet war.

Um weiter zu kommen, sollte jetzt versucht werden, das Eiweiß der Enzymlösung mit Bleiacetat im Überschuß zu fällen und sofort durch Zugabe überschüssigen sekundären Natriumphosphats einerseits das überschüssige Blei aus der Lösung zu entfernen, andererseits ein p_H herzustellen, bei dem das Enzym aus dem Bleieiweiß-Phosphatniederschlag heraus eluiert würde. Je 50 ccm der durch 96 stündige Selbstverdauung mit Na-Acetat erhaltenen Enzymlösung wurden mit 2,5 ccm gesättigter Bleiacetatlösung gefällt und sofort mit 22,5 ccm $^2/_{15}$ mol. Phosphatgemisch von p_H 6,97 versetzt. In zwei anderen Versuchen wurde mit $^4/_{15}$ mol. und $^2/_{15}$ mol. sekundären Na-Phosphat

versetzt. 30 Minuten wurde an der Turbine unter Eiskühlung eluiert und dann filtriert.

Enzymlösung	Versuch	$K_{I:10}$	N mg	Reinheitsgrad
Selbstverd. Na-Acetatlösung	30	0,106 4	13,31	0,0799
Eluiert mit $^4/_5$ mol. Na-Phosphat . .	31	0,091 7	10,97	0,0836
„ „ $^2/_{15}$ „ „ . .	32	0,070 9	10,04	0,0706
„ „ Phosphatpuffer p_H 6,97 .	33	0,042 37	8,668	0,0488

Das beste Resultat lieferte also die Elution mit reinem sekundären Phosphat, die Enzymlösung hatte ein p_H von 6,71. Sie gab mit Tannin noch deutliche Eiweißfällung. Versuche, nun mit Tannin das Enzym an Eiweißkörper gebunden niederzuschlagen und aus der Fällung es in reinem Zustande zu eluieren, schlugen fehl. Es gelang wohl, das Enzym zu fällen, jedoch versagte die Elution vollkommen. Wir begnügten uns deshalb mit dem in Versuch 31 erzielten Resultat und stellten demgemäß für alle weiteren Adsorptions- und Elutionsversuche unsere Enzymlösung folgendermaßen her:

2 g fein zerkleinerter Kälbermagen werden mit 100 ccm 5%iger Natriumacetatlösung 96 Stunden im Brutschrank bei 25° C unter Chloroformzusatz extrahiert und filtriert. 50 ccm des Filtrats werden mit 5 ccm gesättigter Bleiacetatlösung gefällt und sofort 45 ccm $^4/_{15}$ mol. Na-Phosphat zugegeben. ½ Stunde wird dann an der Turbine unter Eiskühlung eluiert und filtriert. Die Verdünnung dieser Enzymlösung beträgt 1 : 2.

Adsorptionsversuche.

Das zu den nachfolgenden Adsorptionsversuchen benötigte Aluminiumhydroxyd wurde nach den Angaben *Willstätters*[1] hergestellt. 100 ccm der Tonerdesuspension enthielten 0,642 g Al_2O_3. Die Suspension wurde den Enzymlösungen durch Ausfließenlassen aus der Pipette unter langsamem Umrühren und Vermeidung von Schütteln und Schaumbildung zugegeben.

Die zur Adsorption ebenfalls benötigte Kaolinsuspension wurde ebenfalls nach dem Vorgange *Willstätters*[2] bereitet. Sie enthielt 0,673 g Kaolin in 10 ccm.

Ermittlung des optimalen Adsorptions-p_H für Aluminiumhydroxyd.

Zu je 40 ccm vorgereinigter Lablösung, deren p_H mit n/2 Milchsäure variiert wurde, setzte man 32 ccm Aluminuimhydroxydsuspension

[1] Liebigs Ann. **422**, 72.
[2] Zeitschr. f. phys. Chem. **133**, 200.

zu und ließ ½ Stunde die Adsorption vor sich gehen. Dann wurde scharf zentrifugiert und die Lösung auf ihre Labungsstärke untersucht.

p_H	Versuch	$K_{unverd.}$	p_H	Versuch	$K_{unverd.}$
4,0	36	0,0735	5,47	40	0,0175
4,29	37	0,0300	5,77	41	0,0320
4,88	38	0,0137	6,48	42	0,103
5,17	39	0,0126			

Darnach liegt das Optimum der Adsorption für die Tonerdeadsorption bei $p_H = 5,1$. Deshalb wurde für alle weiteren Adsorptionsversuche das p_H der Enzymlösung zuerst auf 5,1 kolorimetrisch eingestellt. Selbstverständlich wurden zur Labungsbestimmung alle Lösungen vorher immer auf das p_H der Milch (6,4) zurückgebracht.

Voradsorption: Es sollte jene Tonerdemenge ermittelt werden, die Begleitstoffe wegadsorbiert, aber die Hauptmenge des Enzyms in der Lösung läßt. Zu diesem Zweck wurden zur vorgereinigten, auf p_H 5,1 eingestellten Enzymlösung kleine, aber steigende Mengen Tonerdesuspension gegeben, eine halbe Stunde adsorbiert, zentrifugiert und die Lösung analysiert.

Al_2O_3-Suspension ccm	Versuch	$K_{1:10}$	N mg	Reinheitsgrad
0	43	0,1190	12,44	0,095
2	44	0,117	10,08	**0,116**
4	45	0,072	9,76	0,074
6	46	0,060	9,69	0,062

Das Ergebnis ist, daß durch eine Voradsorption mit 2 ccm Al_2O_3 auf 20 ccm unverdünnter Enzymlösung eine Erhöhung des Reinheitsgrades eintritt.

Erste Adsorption mit Al_2O_3.

60 ccm der vorgereinigten Enzymlösung (Verdünnung 1 : 3) werden mit steigenden Mengen Al_2O_3-Suspension und so viel Wasser versetzt, daß eine Verdünnung 1 : 10 eintritt, und ½ Stunde adsorbiert. Die zentrifugierte Lösung wird auf Labungsstärke geprüft:

Al_2O_3-Suspension ccm	Versuch	$K_{1:2}$	N in 20 ccm unverdünnt mg
0	44	0,585	10,084
5	47	0,121	8,776
10	48	0,0282	7,672
15	—	—	7,604

Beim letzten Versuch mit 15 ccm Tonerdesuspension war quantitative Adsorption des Enzyms eingetreten.

Erste Elution.

Von nun ab wird der Reinheitsgrad wieder durch den Quotienten aus *K* und der phosphatfreien Trockensubstanz ausgedrückt, da nun kein Na-Acetat in den Lösungen mehr vorhanden ist. Als bestes Elutionsmittel haben bereits *Lüers* und *Diem* (l. c.) Phosphatpuffer von $p_H = 6,97$ angegeben, das auch hier Verwendung fand. Je 6 mal 60 ccm vorgereinigter und voradsorbierter Enzymauszug 1 : 3 + 125 ccm H_2O + 15 ccm Al_2O_3-Suspension werden nach der Adsorption zentrifugiert, der Niederschlag an der Zentrifuge einmal mit Wasser gewaschen, die einzelnen Adsorbate vereinigt und mit 120 ccm Phosphatpuffer von $p_H = 6,97$ 30 Minuten unter Turbinierung und Eiskühlung eluiert. Diese Elution entspricht in der Enzymkonzentration dem unverdünnten Enzymauszug.

Versuch	$K_{1:10}$	N in 20 ccm mg	Phosphatfreie Trockensubstanz g	Reinheitsgrad
49	0,1162	0,4272	0,0059	196,94

Die gleiche Adsorption mit anschließender Elution wurde noch einmal unter Zusatz von 25% Alkohol, ein andermal unter Zugabe von 25% Aceton bei der Adsorption wiederholt, jedoch betrug der Reinheitsgrad nur 120,5 bzw. 2,08.

Die obige erste Elution mit einem Reinheitsgrad von 196,94 ist bereits 156 mal reiner als ein käufliches, flüssiges Labpräparat.

Zweite Adsorption mit Al_2O_3.

Die erste Elution wurde mit n/2 Milchsäure auf p_H 5,1 eingestellt, mit Wasser aufs doppelte verdünnt und zu je 40 ccm dieser Enzymlösung steigende Mengen Tonerdesuspension zugegeben. Das Endvolumen war 200 ccm. Nach ½ stündiger Adsorption wurde zentrifugiert und das Filtrat auf die Labungsstärke geprüft.

Al_2O_3-Suspension ccm	Versuch	$K_{1:2}$
0		0,581
5	52	0,0334
10	53	0,0131
15		—

Es war also auch hier wieder mit 15 ccm Tonerdesuspension quantitative Adsorption eingetreten.

Zweite Elution.

40 ccm erster Elution (1 : 2) vom p_H 5,1 werden mit 145 ccm Wasser, beim zweiten Versuch mit 50 ccm Alkohol und 55 ccm Wasser, dann mit 15 ccm Tonerdesuspension versetzt und 30 Minuten adsorbiert. Das zentrifugierte Adsorbat wird einmal mit Wasser gewaschen und mit 20 ccm Phosphatpuffer wie bei der ersten Elution eluiert.

Das Ergebnis war folgendes:

	Versuch	$K_{1:10}$	Phosphatfreie Trockensubstanz g	Reinheitsgrad
Adsorption in wässeriger Lösung, dann Elution	54	0,0980	0,0040	245
Adsorption in alkohol. Lösung, dann Elution	55	0,0877	0,0029	302,4

Dritte Adsorption mit Kaolin.

Je 40 ccm der vom Versuch 55 stammenden, auf p_H 5,1 eingestellten 1 : 2 verdünnten zweiten Elution wurden mit steigenden Mengen Kaolinsuspension versetzt, das Gesamtvolumen auf 200 ccm gebracht und ½ Stunde adsorbiert. Die Filtrate wurden auf ihre Labung geprüft.

Kaolinsuspension ccm	Versuch	$K_{1:2}$	Kaolinsuspension ccm	Versuch	$K_{1:2}$
0		0,4385	9	58	0,0276
3	56	0,0775	12	59	0,0271
6	57	0,0342	15	60	0,0261

Das Enzym wird also vom Kaolin nicht quantitativ adsorbiert, steigende Mengen des Adsorbens bleiben wirkungslos. Es wurde noch versucht, ob eine Änderung des p_H die Adsorption günstiger gestaltet.

Kaolinsuspension ccm	p_H	Versuch	$K_{1:2}$
12	5,1	61	0,0271
12	4,58	62	0,0212
12	4,00	63	0,0181

Es gelingt demgemäß, durch Erhöhung der Azidität die Adsorption günstiger zu gestalten.

Dritte Elution.

Es wurde zunächst versucht, aus dem Kaolinadsorbat das Enzym mit n/100 und n/50 Sodalösung zu eluieren, jedoch erwiesen sich die Elutionen als völlig inaktiv. Dagegen erwies sich das nicht behandelte

Kaolinadsorbat noch als vollkommen wirksam. Das Enzym ist also durch die schwach alkalische Reaktion der verdünnten Sodalösung bereits zerstört worden. Deshalb wurde die Elution mit den milder wirkenden Phosphatpuffern versucht.

Elutionsmittel	Versuch	$K_{1:10}$
Na_2HPO_4	64	0,0140
$2\,KH_2PO_4 + 8\,Na_2HPO_4$ . .	65	0,0662
$4\,KH_2PO_4 + 6\,Na_2HPO_4$ . .	66	0,0675

Es wird also die Kaolinadsorption genau wie das Aluminiumhydroxydadsorbat vom Phosphatpuffer $p_H = 6,97$ am besten eluiert.

Es wurde nun die Elution eines aus wässeriger Lösung und aus 25%iger alkoholischer Lösung erhaltenen Adsorbats mit Phosphatpuffer durchgeführt:

	Versuch	$K_{1:10}$	Phosphatfreie Trockensubstanz g	Reinheitsgrad
Adsorption aus wässeriger Lösung, dann Elution	67	0,0670	0,0020	335
Adsorption aus alkohol. Lösung, dann Elution	68	0,0537	0,0015	358

Der letzte Versuch mit einem Reinheitsgrad von 358 wurde nun einer

vierten Adsorption mit $Al(OH)_3$ und darauffolgenden vierten Elution

unterworfen.

Die dritte Elution konnte nach Einstellung auf p_H 5,1 mit 7 ccm Aluminiumhydroxydsuspension quantitativ adsorbiert werden. Die Phosphatelution lieferte folgendes Ergebnis

Versuch	$K_{1:10}$	Phosphatfreie Trockensubstanz g	Reinheitsgrad
69	0,0534	0,0012	445

Es war von Interesse, die Wirksamkeit dieser schon sehr reinen vierten Elution auch nach der technisch gebräuchlichen *Soxhlet*schen[1] Methode kennenzulernen. 1 ccm der unverdünnten vierten Elution wurde bei 35° C zu 200 g Milch vom Säuregrad 9 gegeben und unter

[1] *Fleischmann*, Lehrb. d. Milchwirtschaft.



Umrühren der Eintritt der beginnenden Gerinnung mit der Stoppuhr ermittelt. Es wurde eine Gerinnungszeit von 9 Minuten 28 Sekunden gefunden:

20 ccm vierter Elution enthalten 0,0012 g Trockensubstanz
1 „ „ „ enthält 0,00006 g „

1 g Trockensubstanz bringt dann 3333333 g Milch in 9,466 Minuten zur Gerinnung. Da beim *Soxhlet*schen Versuch die Gerinnungszeit von 40 Minuten normiert ist und zwischen Labungsgeschwindigkeit und Enzymkonzentration direkte Proportionalität besteht, hätte 1 g Enzym-Trockensubstanz *14,085 Millionen g* Milch zur Gerinnung gebracht.

Fünfte Adsorption und Elution.

Ohne weitere Vorversuche wurde nun noch mit der vierten Elution[1] eine fünfte Adsorption mit 7 ccm $Al(OH)_3$-Suspension vorgenommen und das Adsorbat mit Phosphatpuffer eluiert.

Versuch	$K_{1:10}$	Phosphatfreie Trockensubstanz g	Reinheitsgrad
70	0,0370	0,0008	**462,2**

Wirksamkeitsbestimmung nach Soxhlet.

200 ccm Frischmilch vom Säuregrad 9 werden von 1 ccm unverdünnter fünfter Elution in 12 Minuten 15 Sekunden bei 35° C zur Gerinnung gebracht.

20 ccm fünfter Elution enthalten 0,0008 g Trockensubstanz
1 „ „ „ enthält 0,00004 g „

1 g Trockensubstanz bringt 5000000 g Milch zur Gerinnung, daraus Wirksamkeit *1 : 16,44 Millionen.*

Das Verhalten von Lab und Pepsin bei der Reinigung.

Da es von Interesse war, auch das Verhalten des Pepsins während des Reinigungsganges kennenzulernen, wurde sowohl der ungereinigte Na-Acetatauszug aus dem Kälbermagen als auch das gewonnene reinste Enzympräparat auf die Pepsinwirksamkeit untersucht. Zur Bestimmung wurde das von *R. Ege*[2] verbesserte *Fuld*sche Verfahren verwendet, das ausführlich bereits in der ersten Veröffentlichung von *Lüers* und

[1] Es braucht wohl nicht erwähnt zu werden, daß für jede weitere Etappe im Reinigungsprozeß der ganze vorherige Gang von der Extraktion des Magens über Vorreinigung, Voradsorption usw. jedesmal wiederholt werden mußte.

[2] Zeitschr. f. physiol. Chem. 127, 125.

Diem (l. c.) beschrieben ist. Es kam die gleiche Edestinlösung und das gleiche Pepsinpräparat für die Standardmessungen, wie sie von *Diem* benutzt wurden, zur Anwendung.

1 ccm des 96 Stunden bei 25⁰ selbstverdauten Na-Acetatauszuges hatte bei der Labbestimmung einen *K*-Wert (1 : 10) von 0,12804 und enthielt 0,000545 g acetatfreie Trockensubstanz.

1 g Trockensubstanz entspricht einem *K*-Wert = 234,9. 1 ccm der fünften Elution hat einen *K*-Wert von 0,037, entsprechend 0,000004 g Trockensubstanz. 1 g Trockensubstanz entspricht also einem *K*-Wert von 9250.

Die Wirksamkeit des Chymosins hat also pro 1 g Trockensubstanz vom ungereinigten Auszug bis zur fünften Elution um das $\frac{9250}{234{,}9}$ = *39,38 fache* zugenommen.

Die Pepsinwirksamkeit von 1 ccm des ungereinigten Acetatauszuges beträgt 925 Pepsineinheiten bei 0,00545 g Trockensubstanz. 1 g Trockensubstanz entspricht demgemäß 169730 Pepsineinheiten, 1 ccm der fünften Elution hatte eine Wirksamkeit von 143,6 Pepsineinheiten bei 0,00004 g Trockensubstanz.

1 g Trockensubstanz entspricht also 3590000 Pepsineinheiten. Die Pepsinwirksamkeit pro 1 g salzfreier Trockensubstanz hat also während der Reinigung um das $\frac{3\,590\,000}{169\,730}$ = *21,15 fache* zugenommen.

Vergleicht man diesen Wert mit dem entsprechenden des Chymosins, so sieht man, daß sich die beiden Enzyme durch die einzelnen Stufen der Reinigung hindurch verschieden zu verhalten scheinen, was die Ansicht *Hammarstens* von der Verschiedenheit der beiden Enzyme aufs neue bestätigen würde. Man darf jedoch nicht außer acht lassen, daß bei den äußerst geringen Mengen von Trockensubstanz bereits kleine unvermeidliche Ungenauigkeiten zu größeren Differenzen in den Enzymaktivitäten führen müssen. Berücksichtigt man den komplizierten Gang der verschiedenen vorgenommenen Reinigungsmaßnahmen, so muß vielmehr die in der Größenordnung nicht allzu sehr verschiedene Steigerung der Aktivität beider Enzyme während der Reinigung eher den Gedanken nahelegen, daß die beiden Enzyme Chymosin und Pepsin doch sehr nahe verwandt sind. Jedenfalls läßt sich ein bindender Schluß nach der einen oder anderen Richtung noch nicht ziehen.

Beschreibung des reinsten Präparats.

Zur Vornahme von Eiweißreaktionen und einer Mikrostickstoffbestimmung wurde die fünfte Elution in mehrfach wiederholten Arbeitsgängen portionsweise in größerer Menge hergestellt und im Vakuum

eingeengt. Es wurden insgesamt 25 ccm Lösung mit 0,0751 g phosphatfreier Trockensubstanz gewonnen. Die mit gleichen Teilen dieser Lösung ausgeführten Eiweißreaktionen lieferten im Vergleich mit dem ungereinigten Acetatauszug folgendes Bild:

	Na-Acetat-auszug	Elution V
Biuretreaktion	Stark positiv	Äußerst schwach. Nur durch Vergleich mit einer gleich behandelten eiweißfreien NaOH ist ein minimaler Farbunterschied bemerkbar.
Xanthoproteinreaktion	"	Äußerst schwach. Nur in der Draufsicht ist eine ganz schwache Gelbfärbung zu erkennen.
Triketohydrindenhydrat-reaktion	"	Vollkommen negativ.
*Millon*sche Reaktion	"	" "

Aus diesen Reaktionen geht hervor, daß das reinste Präparat wohl noch Spuren von Peptonen (Biuretreaktion) und ganz geringe Mengen von Körpern, welche die Xanthoproteinreaktion (Phenylalanin, Tryptophan) geben, enthält, daß es dagegen frei von Polypeptiden und Tyrosin ist.

Das gereinigte Enzym gibt sowohl vor wie nach der Inversion mit Salzsäure keine Spur einer Reduktion von *Fehling*scher Lösung.

30,04 mg Trockensubstanz enthalten 0,2064 mg N_2 oder *0,687* % Stickstoff, während der ungereinigte Natriumacetatauszug in 25,32 mg acetatfreier Trockensubstanz 3,396 mg oder 13,43% Stickstoff enthielt.

Zusammenfassung.

Das Ziel der Arbeit, den von *Lüers* und *Diem* (l. c.) erreichten Reinheitsgrad des Chymosins noch zu verbessern, wurde auf folgendem Wege erreicht:

Zunächst wurde nach einer Reihe von Vorversuchen gefunden, daß eine 96 stündige Selbstverdauung des Kälbermagens in Gegenwart von 5 %iger Na-Acetatlösung bei 25° einen Enzymextrakt liefert, der durch Ausbeute und Reinheit des Enzyms für die weitere Reinigung geeignet ist.

Dieser Acetatauszug wird durch Bleiacetat von einem Teil seiner Eiweißkörper befreit und durch Zugabe überschüssigen sekundären Natriumphosphats der Bleiüberschuß gefällt und das Enzym aus der Blei-Eiweiß-Phosphatfällung eluiert.

Mit diesem vorgereinigten Auszug wurden nun eine Reihe aufeinanderfolgender Adsorptionen vorgenommen, für welche die optimalen

Bedingungen (p_H, Mengenverhältnisse) in Vorversuchen festgelegt wurden. Eine Voradsorption mit einer geringen Menge Tonerdesuspension nimmt Begleitstoffe aus der Lösung. Hierauf folgen zwei Tonerdeadsorptionen und Elutionen mit Phosphatpuffer von $p_H = 6{,}97$. Die zweite Elution wird einer Kaolinadsorption mit darauffolgender Phosphatelution unterworfen, woran sich wieder zwei Tonerdeadsorptionen und Phosphatelutionen schließen. Das reinste Enzympräparat in Form der fünften Elution hat eine Labungsstärke von 1 : 16,44 Millionen, gegenüber dem von *Lüers* und *Diem* erreichten Wert von 1 : 7 Millionen und dem käuflichen Handelslab von 1 : 20000 bis 100000. Das Präparat gibt höchstens spurenweise die Biuret- und Xanthoproteinreaktion, wogegen die *Ninhydrin*- und *Millon*sche Reaktion völlig negativ ausfallen. Der Stickstoffgehalt der salzfreien Trockensubstanz beträgt 0,687 %. Das Enzym reduziert weder vor noch nach der Inversion mit Salzsäure *Fehling*sche Lösung.

Die Chymosin- und Pepsinaktivitäten gehen während des Reinigungsprozesses nicht parallel, das Chymosin nimmt um das 39,38fache, das Pepsin um das 21,15fache an Aktivität pro 1 g Trockensubstanz zu. In Anbetracht der experimentellen Schwierigkeiten und der Kompliziertheit des Reinigungsprozesses ist die Differenz der Aktivitätssteigerung beider Enzyme zu klein, als daß daraus ein bindender Schluß auf die Verschiedenheit von Chymosin und Pepsin gezogen werden dürfte.

Versuchsbelege.

Es folgen die Tabellen, welche die zur Labwirksamkeitsbestimmung (K-Werte) dienenden Kurvendaten enthalten.

Nr.	1	2	3	4	5	6	9	10
o. L.	165	165	165	165	165	165	165	165
0	162,5	161	159,5	160,5	160	161,5	160,5	159,5
2	160,5	159	158	158,5	157,5	159	158,5	158,5
4	160	158	161	161	161	158	158	159
6	160,5	159,5	175,5	173	184	160	158,5	166
8	163	163	205	193	226,5	166	159	176,5
10	167	170	240,5	215	276	180	160,5	191,5
12	175,5	178	287	240		204	164,5	208
14	186,5	191,5	346	266,5		225	170	226
16	200	206				254	177	243,5
18	215	223					188,5	262
20	231,5	246,5					201	
22	251	269					217,5	
							239	

Nr.	11	12	13	14	15	16	17	18	19
o. L.	165	165	165	165	165	165	165	165	165
0	159	161	161	159,5	159,5	159	158,5	160,5	160,5
2	157,5	158,5	159	158	158,5	156,5	156	158,5	159
4	161	160,5	158	161	161	158	158,5	170,5	159
6	171	167,5	159,5	186,5	177,5	173	172	215	160,5
8	193,5	182	163	244	219,5	198	200	320	166
10	227,5	202,5	170,5	305	263,5	227,5	245		175
12	263	229	183,5			258,5	300		186,5
14		260	197,5			290			205
16			214						226
18			233,5						250
20			261,5						

Nr.	22	23	24	25	26	27	28	29
o. L.	165	165	165	165	165	165	165	165
0	159	159	161,5	159	160,5	161,5	160,5	162
2	156	157	158,5	156,5	158	159,5	159	160
4	157,5	159	157,5	156	158,5	158,5	162	159
6	163,5	173	157,5	158	160,5	158,5	173	158
8	174	202,5	159	162,5	164,5	159,5	186	157,5
10	187,5	248	162	169,5	172	161,5	198	156,5
12	202,5	297,5	166,5	180	180	165,5	219	156
14	220		172,5	191,5	188,5	170,5	238	157
16	239		180	204,5	198	176	256	158
18	257		190	219	208	182		160
20	280		201	235	217,5	188,5		163
22			213,5		228	195,5		166
24			226		239	204		169
26			239			212,5		173,5
28						222,5		178
30						332,5		183,5
32								190,5
34								199,5
36								209
38								222,5
40								231

Nr.	30	31	32	36	37	38
o. L.	165	165	165	165	165	165
0	160,5	162	161	158	160	160
2	157,5	158	158,5	156,5	159,5	159
4	160,5	159	158	154,5	159	159
6	169	164	159	155	159	159
8	185	174	164	160	159	159
10	206,5	190,5	171	170	159	159
12	232	211	184	185	159	159
14		236,5	198,5	205	159	159
16			216,5	227,5	160	159
18			235		161	159
20			245		162	159
22					163,5	159
24					166	159
26					170,5	159
28					175,5	159
30					182,5	159
32					192	159
34					204,5	159
36					218,5	159
38						159
40						159
42						159
44						159
46						159,5
48						160
50						161
52						162,5
54						164
56						166,5
58						168,5
60						171
62						174
64						177,5
66						182
68						186
70						192
72						197
74						203
76						209
78						216,5
80						223

Nr.	39	40	41	42	43	44	45	46	47
o. L.	165	165	165	165	165	165	165	165	240
0	162	160,5	161	160,5	159	159	159	158	179,5
2	161	159,5	165,5	159	157,5	157	156	157	176
4	160	159	160	163	159	158,5	156	156	174
6	160	159	160	173	169	169	157	156	177,5
8	160	159	160	187	192,5	192	160,5	157,5	197
10	160	159	160	202	233,5	233	168	161	242,5
12	160	159	160	219			183	167,5	
14	160	159	165,5	237			205	178	
16	160	159	159,5				240	193,5	
18	160	159	160,5					215	
20	160	159	162,5					241	
22	160	159	165,5						
24	160	159	169,5						
26	160	159	175,5						
28	160	159,5	183,5						
30	160	159,5	193						
32	160	159	204,5						
34	160	159	219						
36	160	159,5	233						
38	160	160							
40	160	161							
42	160	162							
44	160	164							
46	160	167							
48	160	170							
50	160	174							
52	160,5	179							
54	161	186							
56	161,5	194,5							
58	162,5	205							
60	164	218,5							
62	165,5								
64	168,5								
66	170								
68	172								
70	176								
72	179,5								
74	184								
76	189								
78	195,5								
80	202								
82	211,5								

Nr.	48	49	52	53	54	55	56
o. L.	240	165	235	242	164	166	221
0	180	157,5	175	179	159	159,5	169
2	176,5	154	172	176,5	155	158	164
4	175	155	171,5	175,5	156	157	163
6	174	165	171,5	175,5	159	159	165
8	174	189,5	170	175,5	173	166	170
10	174,5	230,5	168	172	195,5	181,5	178,5
12	173,5		169	173,5	226,5	208	189
14	174		168,5	173		246	203,5
16	174		170,5	173,5			217,5
18	174		170,5	173			
20	175,5		171,5	173			
22	176		173,5	173			
24	177		177,5	173			
26	179		184	173			
28	181,5		189,5	173			
30	185,5		200,5	173			
32	189		212,5	173			
34	194,5		229,5	173			
36	203,5		251,5	173			
38	212,5			173			
40	224			172			
60				176			
62				179,5			
64				181			
66				182			
68				184,5			
70				185,5			
72				189,5			
74				194			
76				199			
78				204,5			
80				211			

Nr.	57	58	59	60	61	62	63	64	65
o. L.	224	222	228	223	240	232	234	173	173
0	172	170	172,5	170,5	178,5	174	174,5	168,5	169
2	168	167,5	169,5	168	174	169	171,5	176,5	165,5
4	166,5	166	168	165,5	173	167,5	171,5	167	165
6	165,5	165	167	165,5	172,5	168	168,5	166,5	164,5
8	165,5	165	167	165,5	170	168	169,5	167,5	164,5
10	165,5	165	166,5	165	169	167,5	169,5	166	168
12	165,5	165	167	165	169,5	168	167,5	167	176
14	167	165	167	165,5	170	168	168	165	188
16	169.5	165	167	165,5	171	169,5	168	165	202,5
18	172	167	168	165,5	173,5	170	170	166,5	222,5
20	174	169	169	168	176,5	170,5	170	167	243,5
22	176	170	170	170,5	179,5	171,5	171	164	
24	183,5	173,5	172	173,5	182,5	172,5	172	164,5	
26	188	175	175,5	174	189,5	175	172,5	164,5	
28	195	179,5	179	178	201	176	175	163	
30	203.5	184	182	181	211,5	180	174,5	164	
32	211	188,5	187,5	181,5		183	177	163,5	
34		194	192	186,5		186,5	178,5	164	
36		199	197,5	191,5		194	182,5	164	
38		207	203,5	199		200,5	185,5	164	
40		214	209,5	206		207,5	189	164,5	
42		223,5	218,5	212		217,5	193	166	
44				220			195,5	166,5	
46							201,5	167,5	
48							209	168	
50							216,5	168,5	
52								172	
54								172,5	
56								173,5	
58								176,5	
60								178	
62								179,5	
64								184	
66								188	
68								194	
70								198	
72								201,5	
74								208,5	
76								212.5	
78								218,5	
80								0	

Nr.	66	67	68	69	70
o. L.	174	165	165	165	165
0	167,5	159,5	158	158	162
2	165,5	158,5	156	157,5	160
4	165,5	157,5	154,5	155	160
6	163,5	158,5	154,5	154	159,5
8	166,5	158	154,5	154	158,5
10	169,5	167,5	156,5	155	157,5
12	180	177	158	156	158
14	194	192,5	165	161	162
16	200,5	214	173,5	167	163,5
18	232		185,5	183,5	162
20			203,5	202	164,5
22			223,5	213	170
24					176
26					186,5
28					203
30					218

Über locker gebundenes Kupfer und Eisen im Blutserum.

Von

Otto Warburg und **H. A. Krebs.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 14. September 1927.)

Unter locker gebundenem Kupfer und Eisen verstehen wir Metall, das mit der Cysteinmethode[1] bestimmt werden kann, ohne daß man das Serum verascht.

Versuchsanordnung.

Wir entnehmen das Blut mit Platinkanülen, lassen es von selbst gerinnen, gewinnen das Serum durch Zentrifugieren und mischen 1 Volumen Serum mit 1 Volumen 0,2 n Salzsäure. Durch den Salzsäurezusatz wird das Bicarbonat ausgetrieben und das Serum kongosauer.

Zur Kupferbestimmung geben wir 0,1 der Mischung (= 0,05 ccm Serum) in 2 ccm Pyrophosphatlösung, zur Eisenbestimmung 0,2 ccm der Mischung (= 0,1 ccm Serum) in 2 ccm Boratlösung, schütteln bei 20° mit Luft und berechnen aus den Anfangsgeschwindigkeiten der Oxydation den Kupfer- und Eisengehalt. Experimentelle Einzelheiten sind aus den Protokollen am Schluß dieser Arbeit zu entnehmen.

In den Tabellen ist der Metallgehalt pro Kubikzentimeter Serum angegeben und außerdem, um Unterschiede des Wassergehalts zu eliminieren, pro Gramm Serumeiweiß.

Berechnung.

Wie früher, so verstehen wir auch im folgenden unter der Oxydationsgeschwindigkeit v immer nur die Anfangsgeschwindigkeit.

---

[1] *O. Warburg*, diese Zeitschr. 187, 255, 1927.

1. Enthält eine Cysteinpyrophosphatlösung, die frei ist von organischer Substanz, die Kupfermenge x, so ist die Oxydationsgeschwindigkeit

$$v = kx, \tag{1}$$

wo k eine Konstante bedeutet. Mißt man v und kennt man k, so kann man x nach (1) berechnen.

Um k zu bestimmen, fügen wir die Kupfermenge Δx hinzu und messen den Geschwindigkeitszuwachs Δv. Dann ist $\frac{\Delta v}{\Delta x} =$

$$\frac{dv}{dx} = k. \tag{1a}$$

Drücken wir v in $\frac{\text{cmm } O_2}{\text{Stunden}}$ und x in Milligrammen aus, so ist für unsere Versuchsanordnung

$$k = 900000.$$

2. Ist die Cysteinpyrophosphatlösung nicht frei von organischer Substanz, sondern enthält sie Serum, so wird ein Teil des Kupfers an das Serum gebunden und geht für die Katalyse verloren. Ist dieser Teil β, so ist die Oxydationsgeschwindigkeit

$$v' = k(1 - \beta)\, x \tag{2}$$

Mißt man v' und kennt man $k(1 - \beta)$, so kann man x nach (2) berechnen.

Um $k(1 - \beta)$ zu bestimmen, fügen wir die Kupfermenge Δx hinzu und messen den Geschwindigkeitszuwachs $\Delta v'$. Ist β konstant, so ist $\frac{\Delta v'}{\Delta x} =$

$$\frac{dv'}{dx} = k(1 - \beta). \tag{2a}$$

Wir finden für unsere Versuchsanordnung im Mittel

$$k(1 - \beta) = 700000.$$

3. Bei der Differenzierung der Gleichung (2) nach x haben wir angenommen, daß β konstant ist. In Wirklichkeit trifft dies nicht zu, sondern β wird mit zunehmendem x kleiner, weil die kupferbindende Substanz des Serums durch Kupfer abgesättigt wird.

Bestimmen wir also $k(1 - \beta)$ nach Gleichung (2a) und berechnen x nach Gleichung (2)

$$x = \frac{v'}{k(1 - \beta)},$$

so finden wir x zu klein. Wieviel dieser Fehler ausmacht, können wir durch Kupferbestimmung im veraschten Serum feststellen.

4. Zur Veraschung des Serums bringen wir 5 ccm Serum in einen Platintiegel, fügen 1 ccm m/2 KH_2PO_4 hinzu, trocknen bei 120° und glühen etwa 12 Stunden bei schwascher Rotglut im *Heraeus*-Ofen. Die rein weiße, alkalisch reagierende Asche wird mit 1 ccm n Salzsäure angesäuert und auf 5 ccm aufgefüllt.

Wurde das Kupfer in dem veraschten und nicht veraschten Serum bestimmt, so fanden wir für vier verschiedene Sera die folgenden Werte:

	Kupfer in 1 ccm Serum	
	verascht	nicht verascht
Pferd	$2{,}5 \cdot 10^{-3}$ mg	$3{,}0 \cdot 10^{-3}$ mg
Mensch	$1{,}4 \cdot 10^{-3}$ „	$1{,}3 \cdot 10^{-3}$ „
„	$1{,}2 \cdot 10^{-3}$ „	$1{,}1 \cdot 10^{-3}$ „
„	$2{,}0 \cdot 10^{-3}$ „	$1{,}5 \cdot 10^{-3}$ „
	$7{,}1 \cdot 10^{-3}$ mg	$6{,}9 \cdot 10^{-3}$ mg

Die nach Veraschung und ohne Veraschung gefundenen Kupfermengen waren also ungefähr gleich. Es geht daraus hervor, daß die Rechnung nach (2) und (2a) nahezu den richtigen Kupfergehalt ergab, ferner daß festgebundenes Kupfer in den vier untersuchten Serumproben nicht vorkam. Trifft dies allgemein zu, so ist das locker gebundene Kupfer gleich dem Gesamtkupfer des Serums.

5. Die Komplikation der Metallbindung durch Serum fällt bei Messungen in Borat fort. Die Cystein-Boratlösung, die alkalischer als die Pyrophosphatlösung ist, entzieht dem Serum das gesamte locker gebundene Metall, sowohl Kupfer als auch Eisen. Hier hat man

$$\left(\frac{d\,v'}{d\,x}\right)_{Cu} = \left(\frac{d\,v}{d\,x}\right)_{Cu},$$

$$\left(\frac{d\,v'}{d\,x}\right)_{Fe} = \left(\frac{d\,v}{d\,x}\right)_{Fe},$$

also

$$(\beta)_{Cu} = 0,$$

$$(\beta)_{Fe} = 0.$$

6. Neben locker gebundenem Eisen kommt in Serum auch festgebundenes Eisen vor, z. B. Blutfarbstoffeisen, das bei unserer Anordnung nicht katalytisch wirkt und deshalb nur nach Veraschung bestimmt werden kann.

Serum des Menschen[1].

Tabelle I enthält das Ergebnis von 12 Messungen. Läßt man bei der Mittelwertbildung die Extreme heraus — Kupfer und Eisen des Versuchs 12 und Eisen des Versuchs 7 —, so enthielt 1 ccm Serum im Mittel $1,7 \cdot 10^{-3}$ mg locker gebundenes Kupfer und $0,7 \cdot 10^{-3}$ mg locker gebundenes Eisen.

Tabelle I.

Serum des Menschen.

Nr.	Serum	Pro ccm Serum mg Cu $\cdot 10^{-3}$	Pro ccm Serum mg Fe $\cdot 10^{-3}$	Pro g Serumeiweiß mg Cu $\cdot 10^{-3}$	Pro g Serumeiweiß mg Fe $\cdot 10^{-3}$
1	♂, 12 Stunden Hunger	1,24	0,85	1,50	1,03
2	♂, derselbe, ³/₄ Stunden nach Nahrungsaufnahme	1,83	0,69	2,22	0,84
3	♂	1,63	1,16	2,14	1,52
4	♂, nüchtern	1,32	0,67	1,62	0,82
5	♂, „ myeloische Leukämie . .	1,91	0,26	2,82	0,38
6	♂, „ lymphatische „ . .	1,50	0,50	1,90	0,64
7	Icterus	1,16	2,42	1,36	2,84
8	♀, nüchtern, perniciöse Anämie . . .	1,42	0,36	2,12	0,54
9	♀, „ Schwangerschaft, 3. Monat	1,87	0,78	2,34	0,98
10	♀, „ „ 9. Monat	2,96	0,32	4,02	0,43
11	♀, Mammacarcinom	1,56	1,26	1,80	1.45
12	♀, „	4,80	0	—	—

Serum von Tieren.

Tabelle II enthält das Ergebnis von 12 Messungen. Im Serum der Vögel wurde weniger Kupfer gefunden als im Serum des Menschen,

Tabelle II.

Serum von Tieren.

Nr.	Tierart	Pro ccm Serum mg Cu $\cdot 10^{-3}$	Pro ccm Serum mg Fe $\cdot 10^{-3}$	Pro g Serumeiweiß mg Cu $\cdot 10^{-3}$	Pro g Serumeiweiß mg Fe $\cdot 10^{-3}$
1	Frosch	1,42	1,32	—	—
2	Hund	1,13	2,67	1,50	3,55
3	„	1,50	2,12	1,97	2.78
4	Kaninchen	1,04	1,13	1,32	1.44
5	Meerschweinchen	1,94	1,46	—	—
6	Ratte	2,76	0,17	—	—
7	„	4,74	1,97	6,06	2,52
8	Taube	0	1,08	0	2,46
9	„	0,08	0,66	0.22	1,80
10	Huhn	0,37	0,09	0,91	0,22
11	Gans	0,41	0,71	0,98	1,70
12	„	0,13	0,79	0,38	2,30

[1] Vgl. *O. Warburg*, Klin. Wochenschr. **6**, Nr. 23, 1927.

im Serum der übrigen Versuchstiere etwa ebensoviel wie im Serum des Menschen. Der Gehalt an locker gebundenem Eisen war im Durchschnitt bei den Tieren größer als beim Menschen.

Macht man Vögel durch Blutentziehung anämisch, so steigt der Kupfergehalt im Serum. In den Versuchen der Tabelle III stieg das Kupfer nach Blutentziehung auf das 3- bis 6fache. Umgerechnet auf Serumeiweiß, enthielt das Serum der anämischen Gänse mehr Kupfer als im Mittel Menschenserum. Während das Kupfer stieg, nahm das locker gebundene Eisen in zwei Fällen ab, in dem dritten nur unwesentlich zu.

Tabelle III.

Wirkung der Blutentziehung.

Nr.	Art des Serums	Pro ccm Serum		Pro g Serumeiweiß	
		mg Cu . 10^{-3}	mg Fe . 10^{-3}	mg Cu . 10^{-3}	mg Fe . 10^{-3}
1	Taube, normal	0,08	0,66	0,22	1,80
	Das gleiche Tier, 3 Tage vorher und 1 Tag vorher je 8 ccm Blut entnommen	0,25	0,32	0,79	1,02
2	Gans, normal	0,41	0,71	0,98	1,70
	Das gleiche Tier, 4 Tage vorher 90 ccm Blut entnommen	1,87	0,98	4,52	2,38
3	Gans, normal	0,13	0,79	0,38	2,30
	Das gleiche Tier, 3 Tage vorher 90 ccm Blut entnommen	0,75	0,28	2,10	0,75

Kupfergehalt nach Injektion von Kupfer.

Da Nahrung und Trinkwasser wechselnde Mengen an Kupfer enthalten und trotzdem der Kupfergehalt im Serum einer Tierart der Größenordnung nach der gleiche ist, so muß es Vorrichtungen geben, die das Kupfer im Serum konstant halten.

Der folgende Versuch zeigt, wie nach intravenöser Injektion von Kupfer der Kupfergehalt des Serums schnell absinkt und im Laufe von 6 Stunden die normale Größenordnung erreicht. Die Versuchstiere waren 160 g schwere Ratten, denen 0,5 mg Kupfer (als $CuSO_4$, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung) in die Schwanzvene injiziert wurde.

Zeit nach der Injektion	10^{-3} mg Cu in 1 ccm Serum	Zeit nach der Injektion	10^{-3} mg Cu in 1 ccm Serum
0 Minuten	43	150 Minuten	6,0
20 „	31	300 „	4,7
40 „	18	24 Stunden	2,2

Protokolle.

Protokoll I.

Bestimmung von Kupfer im nicht veraschten Serum, Serum Dr. *Krebs*, nüchtern.

20°. Gasraum Luft. p_H 7,64.

	Gefäß A.	Gefäß B.	Gefäß C.
Birne	0,1 ccm Cysteinlösung (mit 6 mg Cysteinchlorhydrat)	wie A	wie A
	—	+ 0,1 ccm verdünntes Serum (1 Vol. + 1 Vol. n/5 HCl)	wie B
	—	—	+ 0,1 ccm Kupferlösung = 1 . 10⁻⁴ mg Cu
Hauptraum	2 ccm Pyrophosphatlös.	wie A	wie A
Volumina . . ccm	v_F 2,1 v_G 14,98	v_F 2,2 v_G 13,77	v_F 2,3 v_G 13,67
Gefäßkonst. . qmm	k_{O_2} = 1,40	k_{O_2} = 1,29	k_{O_2} = 1,28
	mm	mm	mm
Nach 10'	— 0,5	— 7	— 17,5
„ 20'	— 0,5	— 13,5	— 34,5
„ 30'	— 1,5 = 2,1 cmm	— 21 = 27 cmm	— 52,5 = 67 cmm
		$x = \frac{(27-2) . 2}{800\,000} = 6{,}3 . 10^{-5}$ mg In 1 ccm Serum: $1{,}26 . 10^{-4}$ mg	$\frac{dv}{dx} = W_{Cu} = 800\,000$

Protokoll II.

Bestimmung von Kupfer und Eisen im nicht veraschten Serum. Gesunde Frau.

a) Kupfer. 20°. Gasraum Luft. p_H 7,64.

	Gefäß A.	Gefäß B.	Gefäß C.
Birne	0,1 ccm Cysteinlösung mit 6 mg Cysteinchlorhydrat	wie A	wie A
	—	+ 0,1 ccm verdünntes Serum (1 Vol. + 1 Vol. n/5 HCl	wie B
	—	—	+ 0,1 ccm Kupferlösung = 1 . 10⁻⁴ mg Cu
Hauptraum	2 ccm Pyrophosphatlös.	wie A	wie A
Volumina . . ccm	v_F 2,1 v_G 14,98	v_P 2,2 v_G 13,77	v_F 2,3 v_G 13,67
Gefäßkonst. . qmm	k_{O_2} = 1,40	k_{O_2} = 1,29	k_{O_2} = 1,28
	mm	mm	mm
Nach 10'	— 0,5	— 11,5	— 19
„ 20'	— 1,0 = 1,4 cmm	— 22,5 = 29 cmm	— 38 = 49 cmm
		$x = \frac{(29-1{,}4) . 3}{600\,000} = 1{,}38 . 10^{-4}$ mg In 1 ccm Serum: $2{,}76 . 10^{-3}$ mg	$\frac{dv}{dx} = W_{Cu} = 600\,000$

b) Eisen. 20°. Luft. p_H 9,3.

	Gefäß A.	Gefäß B.	Gefäß C.	Gefäß D.
Birne . . .	0,1 ccm Cysteinlös. mit 6 mg Cysteinchlorhydrat	wie A	wie A	wie A
	—	+ 0,2 ccm verdünntes Serum (1 Vol. Serum + 1 Vol. n/5 HCl)	wie B	wie B
	—	—	+ 0,1 ccm Cu-Lös. = $4 \cdot 10^{-4}$ mg Cu	+ 0,1 ccm Fe-Lös. = $4 \cdot 10^{-4}$ mg Fe
Hauptraum	2 ccm Boratlösung	wie A	wie A	wie A
Volumina ccm	v_F 2,1 v_G 14,98	v_F 2,3 v_G 13,67	v_F 2,4 v_G 13,55	v_F 2,4 v_F 14,91
Gefäßkonst. qmm	$k_{O_2} = 1{,}40$	$k_{O_2} = 1{,}28$	$k_{O_2} = 1{,}27$	$k_{O_2} = 1{,}40$
	mm	mm	mm	mm
Nach 20′	−1,5	− 6	−10	−17,5
„ 40′	−3,5	−13	−22	−35,5
„ 60′	−5,5 = 7,7 cmm	−19,5 = 25 cmm	−34 = 43 cmm	−54,5 = 76 cmm
		Für Cu gehen ab 12,4 cmm. Also $x_{Fe} = \frac{25-12{,}4-7{,}7}{127\,000} = 3{,}9 \cdot 10^{-5}$ mg. In 1 ccm Serum: $0{,}39 \cdot 10^{-3}$ mg	$\left(\frac{dv}{dx}\right)_{Cu} = W_{Cu} = 45\,000$	$\left(\frac{dv}{dx}\right)_{Fe} = W_{Fe} = 127\,000$

Zur physikalischen Chemie des Fibrinogens.

Von

R. Nordbö.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Oslo.)

(Eingegangen am 18. September 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

I. Einleitung.

Als Grundlage einer physikalisch-chemischen Theorie der Blutgerinnung ist eine genaue Kenntnis der Eigenschaften und besonders des Ampholytcharakters des Fibrinogens notwendig.

Die vorliegende Untersuchung wurde ausgeführt, um den isoelektrischen Punkt (IEP), die Flockungszone und das Säure- und Basenbindungsvermögen des Fibrinogens zu bestimmen.

Mehrere Forscher haben sich schon besonders mit den beiden ersten Größen beschäftigt. Die Angaben der verschiedenen Forscher weichen jedoch, wie man sieht, ganz bedeutend voneinander ab. *Stuber* und *Funck* (1) bestimmten die Wanderungsrichtung im elektrischen Felde und verwendeten zu diesen Versuchen dialysiertes, salzfreies Fibrinogen. Sie fanden bei p_H 4,7 eine kathodische, bei p_H 5,0 eine schwach kathodische und bei p_H 5,3 eine anodische Wanderung. *De Waele* (2) fand einen IEP des Fibrinogens bei p_H 6,9. Die Methode der Bestimmung war, wie aus den Angaben hervorzugehen scheint, genau dieselbe wie die von *Stuber* und *Funck* angewandte. *Kugelmass* (3) findet ein Flockungsoptimum des Fibrinogens bei p_H 8. *Wöhlisch* und *Schloss* (4) bestimmten das Flockungsoptimum des Fibrinogens in 0,85%iger Kochsalzlösung zu p_H 4,46. (Bei einer Konzentration von 0,085% NaCl lag das Flockungsoptimum bei p_H 4,85.) *Quagliariello* (5) gibt als Optimum der Ausflockung von Fibrinogen p_H 4,9 an.

II. Methode.

Das Verbindungsvermögen des Fibrinogens wurde mittels potentiometrischer Titration bestimmt. Als theoretische Grundlage gilt folgende Betrachtung:

Bezeichnen wir mit $R.NH_2.HOH$ das Fibrinogen als Base (indem wir uns nicht darum kümmern, ob es sich um eine mehrsäurige Base handle oder nicht), dann können wir für das salzsaure Salz schreiben $R.NH_2.HCl$. Wir bekommen das Chlorhydrat, wenn wir zu einer Fibrinogenlösung eine gewisse Menge HCl setzen, so daß wir auf der sauren Seite des IEP sind. Wegen des Überschusses an Salzsäure können wir von einer Bildung eines Na-Fibrinogenats absehen — die Dissoziation des Fibrinogens als Säure wird ganz zurückgedrängt sein, so daß die H-Ionen auf Rechnung der Salzsäure geschrieben werden müssen.

Als Salz einer starken Säure (HCl) und einer schwachen Base (Fibrinogen) wird das Chlorhydrat hydrolysiert sein:

$$R.NH_2.HCl = R.NH_2.HOH + HCl,$$

$$K_{\text{Hydrolyse}} = \frac{[HCl][R.NH_2.HOH]}{[R.NH_2.HCl]} = \frac{[H^{\cdot}]x}{y}, \qquad (A)$$

indem wir die Salzsäure als praktisch vollständig dissoziiert ansehen und deshalb statt [HCl] einfach $[H^{\cdot}]$ setzen können.

Die Menge HCl, welche als Fibrinogenchlorhydrat gebunden ist, hängt also von der H-Ionenkonzentration ab (bzw. von einer Potenz der H-Ionenkonzentration). Erst wenn diese sehr groß ist, wird die Hydrolyse so stark zurückgedrängt sein, daß wir alles Fibrinogen als in Chlorhydrat umgewandelt ansehen können. Von einer bestimmten H-Ionenkonzentration aufwärts müssen wir eine konstante und maximale Menge von Fibrinogenchlorhydrat nachweisen können, d. h. wir haben ein konstantes Säurebindungsvermögen.

Genau dieselben Betrachtungen können geltend gemacht werden für das Na-Fibrinogenat auf der alkalischen Seite des IEP. Dieses wird hydrolysiert sein nach der Gleichung:

$$R.COONa \rightleftharpoons R.COOH + NaOH.$$

Nach der Formel (A) ist, bei einer gegebenen H-Ionenkonzentration, eine bestimmte Menge des Fibrinogens als freie Base vorhanden. Nun ist die Löslichkeit dieser Base eine beschränkte. Es wird deshalb, besonders in konzentrierten Lösungen, gegebenenfalls mehr Base da sein, als der Löslichkeit entspricht, und etwas davon wird ausgefällt, bildet eine feste Phase. Je mehr aber die H-Ionenkonzentration wächst, desto mehr von der Base löst sich unter Bildung von Fibrinogenchlorhydrat.

Wenn diese Betrachtungsweise gültig ist, muß man in konzentrierten Lösungen von Fibrinogen, unter sonst gleichen Bedingungen, eine breitere Flockungszone finden als in dünneren Lösungen. Dies stimmt auch, wie die Tabelle I zeigt (vgl. unten).

Praktische Ausführung.

a) Darstellung der Fibrinogenlösungen.

Zur Darstellung der Fibrinogenlösungen wurde teils Oxalatplasma, teils $MgSO_4$-Plasma von Pferdeblut verwendet. Aus diesen Plasmata wurde das Fibrinogen durch halbe Sättigung mit NaCl ausgesalzen.

Das Blut wurde in 25 %iger $MgSO_4$-Lösung aufgefangen (1 Volumen 25 %iger $MgSO_4$-Lösung + 4 Volumen Blut), *sofort* scharf zentrifugiert und dann die oberen zwei Drittel des klaren, blaßgelben Plasmas abgehoben und über Nacht im Eisschrank bei 3° aufbewahrt. Dann wurde nochmals zentrifugiert und das jetzt klare Plasma zur Fibrinogendarstellung verwendet *($MgSO_4$-Plasma)*.

Genau in derselben Weise wurde bei Darstellung von Oxalatplasma vorgegangen: Das Pferdeblut wurde in 0,5 %igem Na-Oxalat aufgefangen (1 Volumen 0,5 %iges Na-Oxalat + 4 Volumen Blut) (*Oxalat-Plasma*).

In einem Falle wurde Oxalatplasma in genau derselben Weise aus bei Aderlaß gewonnenem Menschenblut dargestellt. Dieses Fibrinogen zeigte dieselben Fällungs- und Lösungsverhältnisse wie das aus Pferdeblut dargestellte Fibrinogen.

Das Fibrinogen wurde nun durch Zusatz eines gleichen Volumens gesättigter, reiner NaCl-Lösung ausgesalzen, zwischen Uhrgläsern ausgequetscht und wiederholend mit destilliertem Wasser gespült. Hierbei wurden etwaige beim Aussalzen mitgerissene Eiweiß- und Eiweißspalt-Produkte und leicht lösliche Substanzen, wie Salze, größtenteils entfernt, gleichzeitig ging natürlich viel Fibrinogen verloren.

Das so gereinigte Fibrinogen wurde in so viel 0,85 %iger Kochsalzlösung gelöst, wie etwa der Hälfte des ursprünglichen Plasmas entsprach. Dann wurde NaCl in Substanz zugesetzt, bis die Lösung etwa 15 % davon enthielt, und das ausgefällte Fibrinogen mit destilliertem Wasser gespült und in 0,85 %iger NaCl-Lösung gelöst. Diese Lösung wurde zu den Versuchen verwandt.

Zum Vergleich wurde eine Probe davon 20 Tage im Eisschrank bis zur völligen Salzfreiheit dialysiert und von dem bei der Dialyse ausgefällten Eiweiß befreit. Nach 20tägiger Dialyse — wobei anorganische Salze entfernt waren — war immer noch viel Fibrinogen in der Dialysierhülse in Lösung geblieben. Es wurde dann NaCl zugesetzt, bis die Lösung wieder 0,85 % NaCl enthielt. Diese Lösung zeigte bei den Versuchen das gleiche Verhalten wie das nicht dialysierte Fibrinogen.

Es wiederholte sich die alte Erfahrung, daß ausgefälltes Fibrinogen nach einiger Zeit im ausgefällten Zustande irreversible Änderungen aufweist. Man bekommt keine echte Lösung mehr, sondern nur eine Suspension kleiner Eiweißteilchen, bzw. sogar „Fibrinogene" mit einem anderen IEP.

b) Bestimmung der Breite der Flockungszone bei variierter Konzentration von Fibrinogen.

Zu einer Reihe von Fibrinogenlösungen verschiedener Konzentration wurde Salzsäure (0,85% NaCl enthaltend) in Überschuß zugesetzt und dann tropfenweise NaOH (0,85% NaCl enthaltend), bis zur beginnenden Ausflockung des Fibrinogens. Dann wurde die H-Ionenkonzentration gemessen und der Stickstoffgehalt nach *Kjeldahl* bestimmt.

c) Ausführung der potentiometrischen Titration zur Bestimmung des Verbindungsvermögens und des IEP des Fibrinogens.

Es wurden gleiche Volumina von Fibrinogenlösung und von 0,85%iger NaCl-Lösung in zwei verschiedenen Bechergläsern abgemessen und zu jeder dieser Lösungen *genau* dieselbe Menge einer n/50 Salzsäure gesetzt. Die beiden Lösungen wurden dann mit n/50 NaOH titriert und die H-Ionenkonzentration unter Anwendung der Chinhydronelektrode bei konstanter Rührung gemessen. Die Salzsäure und die Natronlauge waren mit Rücksicht auf NaCl 0,85%ig gemacht, wobei die NaCl-Konzentration während der Titration praktisch nicht geändert wurde.

Da in den beiden Lösungen Salzgehalt, Säuregehalt und Volumen gleich sind, ist eine Differenz in der H-Ionenkonzentration auf Rechnung des Fibrinogens zu schreiben. Die Differenz in der NaOH-Menge, die den beiden Lösungen zugesetzt werden muß, um dieselbe H-Ionenkonzentration zu erreichen, gibt ohne weiteres an, wieviel HCl als Fibrinogenchlorhydrat bei der gegebenen H-Ionenkonzentration gebunden ist.

In dem Punkte, wo diese Differenz maximal und konstant ist, ist alles Fibrinogen als Chlorhydrat vorhanden, und die Differenz gibt das maximale Säurebindungsvermögen des Fibrinogens.

Da die Wiederauflösung des ausgefällten Fibrinogens, wie die Reaktion überhaupt, eine gewisse Zeit beansprucht, macht sich auf der alkalischen Seite des IEP die Kohlensäure bemerkbar, und die angeführten Werte des Basenbindungsvermögens sind nur als Annäherungswerte zu betrachten. Jede Titration wurde zweimal ausgeführt, und die Resultate zeigten vollständige Übereinstimmung.

III. Versuchsergebnisse.

a) Breite der Flockungszone bei variierter Konzentration von Fibrinogen.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle I zusammengestellt: Links, als Maß für den Fibrinogengehalt, sind angegeben die Milligramm N (nach *Kjeldahl* bestimmt) in 100 ccm der Lösung, rechts die p_H-Werte, zwischen denen im sauren Gebiet die eben beginnende Ausflockung stattfindet:

Tabelle I.

mg N	p_H
33,3	1,10 — 2,44
26,3	3,40 — 3,64
5,4	— 4,16
1,2	4,42 — 4,75

b) Potentiometrische Titration.

Die Ergebnisse einer Reihe von Titrationen verschiedener Fibrinogenlösungen, dargestellt von $MgSO_4$-Plasma und Oxalat-Plasma von Pferdeblut, sowie einer Titration einer Fibrinogenlösung von Oxalat-Plasma aus durch Aderlaß gewonnenem Menschenblut, stimmten vollständig überein.

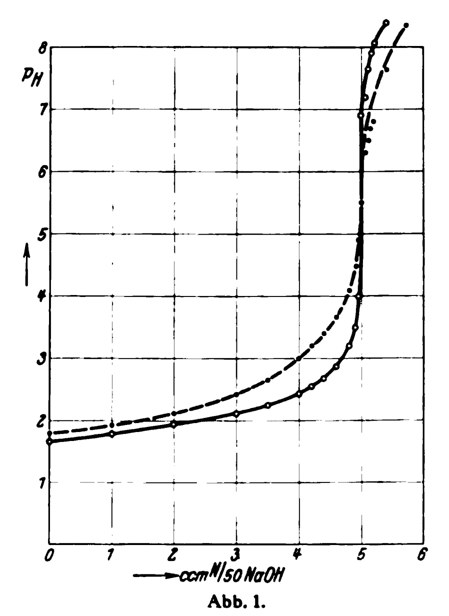


Abb. 1.

Die Zahlen einer der ausgeführten Titrationen sind in der Tabelle II zusammengestellt: Die Kolonne I enthält die zugesetzten Mengen NaOH, die Kolonne II die p_H-Werte, gefunden bei der Titration der Lösung *mit* Fibrinogen (die Menge von Fibrinogen entsprach in diesem Falle 2 mg N), die Kolonne III die p_H-Werte, gefunden bei der Titration der Lösung *ohne* Fibrinogen. Dauer der Titration 2 + 2 Stunden.

Zur Veranschaulichung der Verhältnisse ist die Titrationskurve graphisch dargestellt (Abbildung 1). Als Ordinaten sind die p_H-Werte, als Abszissen die zugesetzten Kubikzentimeter der Natronlauge abgesetzt. Die gestrichelte Kurve ist die Titrationskurve der Lösung *mit* Fibrinogen.

Tabelle II.

I ccm n 50 NaOH	II p_H (mit Fibrinogen)	III p_H (ohne Fibrinogen)
0	1,77	1,65
1	1,93	1,76
2	2,11	1,93
3	2,42	2,11
3,5	2,65	2,24
4	3,00	2,43
4,2	3,20	2,55
4,4	3,40	2,68
4,6	3,65	2,85
4,8	4,10	3,20
4,9	4,50	3,50
4,95	4,91	4,00
5	5,50	6,91
5,05	(6,30)	7,20
5,1	(6,50)	7,66
5,15	(6,68)	7,90
5,2	(6,81)	8,05
5,4	(7,65)	8,39
5,7	(8,34)	

Aus der Tabelle I geht hervor, daß die Flockungszone von der Fibrinogenkonzentration abhängig ist, indem die Zone um so breiter ist, je größer die Konzentration.

Aus der Tabelle II und aus der aufgezeichneten Kurve ist ersichtlich, daß das Fibrinogen bei p_H-Werten unter 5 Wasserstoffionen bindet und bei p_H-Werten über 6 Wasserstoffionen frei macht. Der Kurvenschnittpunkt liegt bei p_H etwa 5,5. Hier ist gleichviel Säure und Base vom Fibrinogen gebunden (bzw. weder Säure noch Base). Dieser Punkt wäre dann als IEP des Fibrinogens zu bezeichnen.

Wie aus Tabelle II hervorgeht, ist das Säurebindungsvermögen ungefähr konstant bei p_H-Werten unter 2. Aus der aufgezeichneten Kurve sieht man, daß dann 1 ccm n/50 HCl gebunden ist. Die angewandte Fibrinogenlösung enthielt 2 mg N (nach *Kjeldahl* bestimmt). Berechnet man nach der Elementaranalyse *Hammarstens* (6) von reinem Pferdefibrinogen die diesem N-Gehalt entsprechende Fibrinogenmenge, so findet man 12 mg Fibrinogen. Demnach bindet 1 mg Fibrinogen maximal 0,06 mg HCl.

Die Konzentration der angewandten Fibrinogenlösungen variierte zwischen einem Stickstoffgehalt von 5,2 mg pro 100 ccm und 44 mg pro 100 ccm. Das Säurebindungsvermögen (berechnet pro Milligramm N im Fibrinogen) zeigte sich unabhängig von der Konzentration des Fibrinogens.

IV. Zusammenfassung.

1. Der *isoelektrische Punkt* des Fibrinogens wurde mittels elektrometrischer Titration zu p_H etwa 5,5 gefunden.

2. Die Breite der *Flockungszone* wächst mit der Konzentration des Fibrinogens.

3. Das *Säurebindungsvermögen* des Fibrinogens bei einem Kochsalzgehalt von 0,85 % wurde gleich 0,06 mg HCl pro Milligramm Fibrinogen gefunden.

V. Literatur.

1) Diese Zeitschr. **126**, 142, 1922. — 2) Ann. de physiol. et de physicochimie biologique **3**, 94, 1927. — 3) Arch. intern. de physiol. **21**, 139, 1923. — 4) Zeitschr. f. Biol. **85**, 542, 1927. — 5) Arch. di sc. biol. **8**, 35, 1926. — 6) Pflügers Arch. **22**, 431, 1880.

Über die Adsorption der Urease durch Cholesterin.

Von

Martin Jacoby.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 19. September 1927.)

Früher[1] habe ich gezeigt, daß die Urease an Fibrinflocken adsorbierbar ist und in adsorbierter, ungelöster Form wirksam ist. Zusammen mit *Shimizu* wurde dann gefunden, daß auch an Calciumphosphat und an Cholesterin eine Adsorption von Urease stattfindet[2]. Dabei ergab sich, daß ohne Berücksichtigung der Auxokörper eine klare Erkenntnis des Umfangs der Adsorption nicht möglich ist. Sowohl in den Versuchen mit *Shimizu* wie in solchen mit *Hosokawa*[3] ergab sich, daß Adsorbate an Cholesterin ohne Auxokörperzusatz nur eine sehr geringe Wirksamkeit entfalten, die aber durch Auxokörperzusatz enorm gesteigert wird. Während die Adsorption uns recht gut gelang, hatten wir bei Elutionsversuchen sehr geringe Erfolge. Neuerdings haben *v. Euler* und *Brunius*[4] Adsorptionsversuche mit Urease angestellt, bei denen ihnen mit Kaolin eine ganz gute Adsorption gelang, die adsorbierte Urease konnte mit Soda bis zu einem gewissen Grade eluiert werden. Wir haben mit Kaolin entsprechende Versuche wie *v. Euler* und *Brunius* angestellt und sind zu vergleichbaren Resultaten gelangt. In ihrem besten Versuche erhielten *v. Euler* und *Brunius* folgendes Ergebnis, ausgedrückt in n/10 NH_3 Kubikzentimeter: 10 Minuten 0,88, 20 Minuten 1,62, 30 Minuten 2,47. Das sind absolut sehr kleine Ausschläge.

Nach meiner Meinung ist es zweckmäßig, bei Adsorptionsversuchen mit Urease optimale Wirkungsbedingungen durch einen Auxokörper

---

[1] *M. Jacoby*, Über die Adsorption von Ureasen und ihre Wirksamkeit in ungelöster Form, diese Zeitschr. **74**, 93, 1916.

[2] *M. Jacoby* und *T. Shimizu*, ebendaselbst **128**, 100 u. 103, 1922.

[3] *T. Hosokawa*, ebendaselbst **149**, 363, 1924.

[4] *v. Euler* und *Brunius*, diese Zeitschr. **183**, 1, 1927.

herzustellen. Aus diesem Grunde haben wir unsere früheren Cholesterinversuche wieder aufgenommen und jetzt einen quantitativ klaren Überblick über die Wirkung des Cholesterins erhalten. *Willstätter* und seine Mitarbeiter sind bei Enzymisolierungen auch mehrfach darauf aufmerksam geworden, daß Isolierungen nur bei optimalen Milieubedingungen vergleichbar sind. Es scheint uns aber, daß bei der Urease das Milieu durch das Eingreifen der Auxokörper eine so besonders bedeutsame Rolle spielt, daß man bei ihr diese Verhältnisse am wenigsten vernachlässigen darf.

Unsere lange zurückliegende Feststellung von der Wirksamkeit der Urease in unlöslicher, adsorbierter Form hat inzwischen an Interesse gewonnen, als *Sumner*[1] gezeigt hat, daß auch der kristallisierte Eiweißkörper, den er mit hochwirksamer Ureasewirkung aus Jackbohnen isolieren konnte, sehr leicht ohne Verlust der Wirksamkeit in die unlösliche Form übergeht. Man könnte sich jetzt fragen, ob überhaupt Adsorptionsversuche mit Urease noch Interesse haben, falls *Sumner* mit Recht das kristallisierte Eiweiß als den Träger der Ureasewirkung annimmt. Mir scheint das durchaus der Fall zu sein, selbst wenn die Versuche für die Enzymisolierung ohne Interesse sein sollten, denn wir gelangen wohl jetzt in eine Forschungsperiode, in der Eigenschaften der Enzyme wie ihr Verhalten bei der Adsorption für die Charakterisierung der Enzyme Bedeutung gewinnen. Dabei darf man nicht nur an die spezifische Wirkung des Enzyms denken, sondern auch an die Stellung der Wirkungsgruppe zum ganzen Enzymkomplex und an die Fixierung des Enzyms in der Zelle, die allmählich im biologischen Interesse auch geklärt werden muß.

Aus den zahlreichen Versuchen führen wir Beispiele an, welche die Wirkung des Cholesterins demonstrieren. Alle Versuche wurden mit demselben gut wirksamen Jackbohnenpräparat (*Arlco*-Urease) ausgeführt. Das Präparat ist im Phosphatgemisch klar löslich, es wurde aber die täglich frisch bereitete Lösung immer besonders filtriert. Die Bedingungen wurden optimal eingestellt, indem die Gemische mit Phosphaten (m/3 p_H 7,17) gepuffert wurden. Jede Probe enthielt 5 mg Cyankalium, was nach unseren vielen, auch jetzt wieder besonders gesicherten Erfahrungen eine optimale Aktivierung bewirkt.

Zunächst schildere ich einen Versuch, der die gute Proportionalität bei optimalen Bedingungen zeigt, einen Überblick über den Umfang der Adsorption der Urease gibt und erkennen läßt, wie enorm der Unterschied zwischen der Wirkung bei Zusatz und ohne Zusatz von Cyankalium ist.

Es wurden vier Proben angesetzt, die sämtlich 0,3 ccm Toluol, 5 mg Cyankalium, 400 mg Harnstoff und 45 ccm Phosphatgemisch (m/3 p_H 7,17) enthielten. Probe 1 2 mg, Probe 2 1 mg, Probe 3 0,75 mg, Probe 4 0,5 mg Urease.

---

[1] *Sumner*, Journ. of biol. Chem. **69**, 435, 1926.

Zwei weitere Proben von je 5 mg Urease in 10 ccm Phosphatgemisch werden mit je 0,02 g Cholesterin, gelöst in 0,5 ccm Alkohol, ausgefällt, der entstehende Niederschlag nach kurzem Umrühren sofort abfiltriert und mit 10 ccm Phosphatgemisch (m/3 p_H 7,17) gewaschen. Dann wird je ein Niederschlag in entsprechenden Ansätzen wie oben behandelt; Probe 5 ohne Cyankalium, Probe 6 mit 5 mg Cyankalium.

Brutschrankdauer in allen Versuchen 20 Stunden.

1.	2,00 mg	130,0 ccm	n/10	97,5 %
2.	1,00 „	66,5 „	n/10	49,8 %
3.	0,75 „	49,6 „	n/10	37,2 %
4.	0,50 „	34,1 „	n/10	25,6 %
5.	Niederschlag ohne Cyankalium	12,9 „	n/10	9,7 %
6.	Niederschlag mit Cyankalium .	109,5 „	n/10	82,0 %

Von den 5 Milligrammen Urease ist also 1,6 mg = 32 % adsorbiert worden, wovon nur 0,19 mg = 3,8 % ohne Zusatz von Cyankalium manifest werden.

Im nächsten Versuch werden bei sonst gleichen Bedingungen drei Niederschläge mit je 10 ccm Phosphatlösungen (p_H 7,17) ausgewaschen.

1\. p_H 4,49 2. p_H 7,17 3. p_H 9,18

In einer weiteren Probe 4 wird anstatt mit 0,02 g Cholesterin in 0,5 ccm Alkohol mit 0,08 g Cholesterin in 2 ccm Alkohol ausgefällt. Der entstandene Niederschlag wird ebenfalls mit 10 ccm Phosphat (p_H 7,17) ausgewaschen.

Ansätze wie im vorigen Versuch, überall 5 mg Cyankalium.

1\. 86,5 % 2. 88,1 % 3. 64,6 % 4. 86,1 %.

Das Waschen mit alkalischem Phosphat setzt also erheblich die Wirksamkeit herab, die Menge des Cholesterins ist in weitem Umfange ohne Bedeutung.

Die nächsten Versuche geben entsprechende Resultate. Hier wurden die Niederschläge mit 20 ccm Phosphatgemisch gewaschen.

p_H der Waschflüssigkeit	Versuch A	Versuch B
7,17	76,1	77,0
9,18	53,1	52,3

Durch Behandlung mit alkalischer Phosphatmischung tritt also eine Abschwächung ein von

26,7, 30,2 und 32,1 %.

Der nächste Versuch zeigt nebeneinander die Verhältnisse ohne Cyankalium und mit Cyankalium, und zwar:

A. in einer bestimmten Quote der Ausgangslösung;

B. die Wirkung des durch 0,01 g Cholesterin erhaltenen Niederschlags nach Waschen mit 10 ccm Phosphatgemisch (p_H 7,17);

C. die Wirkung des Filtrats in einer entsprechenden Quantität wie in der Ausgangslösung, aber nach Entfernung des adsorbierten Anteils.



	Ohne Cyankalium	Mit Cyankalium
A	11,7	59,6
B	9,8	71,6
C	9,0	45,8

Die Berechnung ergibt bei den Versuchen ohne Cyankalium
eine Adsorption von 8,4 %, berechnet nach der Wirksamkeit des Adsorbats,
„ „ „ 23,0 %, „ „ „ „ „ Filtrats.

Bei den Versuchen mit Cyankalium
eine Adsorption von 12,0 %, berechnet nach der Wirksamkeit des Adsorbats,
„ „ „ 23,2 %, „ „ „ „ „ Filtrats.

Zusammenfassung.

Cholesterin adsorbiert die Urease, die Wirksamkeit des adsorbierten Enzyms wird durch Auxokörper sehr verstärkt. Durch Behandlung des Adsorbats mit Alkali wird die Wirkung des Adsorbats vermindert. Über die Elution des adsorbierten Enzyms wird später berichtet werden.

Über den Mechanismus der alimentären Hyperglykämie nach Versuchen mit Lävulosefütterung.

Von

Friedrich Kronenberger und **Paul Radt.**

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 19. September 1927.)

Führt man Tieren oder Menschen per os Traubenzucker zu, so kann man schon nach ganz wenigen Minuten bereits während der Mahlzeit eine Hyperglykämie nachweisen. *Eisner* und *Forster*[1], welche auf diese Erscheinung in einer im hiesigen Laboratorium ausgeführten Arbeit zuerst aufmerksam machten, deuteten das Phänomen so, daß der Zucker im Magendarmkanal auf reflektorischem Wege die Leber veranlaßt, Zucker auszuschütten, wodurch es dann zur sofortigen Hyperglykämie kommt. Immerhin haben *Grunke* und *Hesse*[2] — ebenfalls im hiesigen Laboratorium — einen Befund erhoben, der zunächst leichter durch schnelle Resorption des verfütterten Zuckers sich erklären ließ. Sie fanden nämlich, daß zwar nach Erschöpfung des Glykogendepots der Leber die Hyperglykämie durch Adrenalin nicht mehr zustande kommt, wohl aber noch die Fütterungs-Hyperglykämie, so daß man hier an eine blitzartige Zuckerresorption denken kann. Zur weiteren Klärung dieser Frage, deren Bedeutung auch durch die neuesten Mitteilungen von *Häussler* und *O Loewi*[3] hell beleuchtet wird, haben wir auf Vorschlag von Herrn Professor *Jacoby* noch einen anderen Weg eingeschlagen. Wir untersuchten das Auftreten von Lävulose im Blute nach Lävulosefütterung, da durch die Heranziehung eines körperfremden Zuckers es möglich ist, leichter zu entscheiden, ob die Hyperglykämie durch Leberzucker oder durch Nahrungszucker bedingt ist.

---

[1] Berl. Klin. Wochenschr. 1921, S. 839 und Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **52**, 214, 1926.

[2] Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **54**, 439, 1927.

[3] Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **123**, 1927.

Untersuchungen mit Lävulosefütterung haben schon andere Autoren ausgeführt (*Isaac*[1], *Spence* und *Brett*[2]) jedoch beziehen sich ihre Versuche nicht auf die hier interessierende Frage der schnell einsetzenden Hyperglykämie Um diese Frage prüfen zu können, mußte erst eine brauchbare Reihenmethode der Lävulosebestimmung zur Verfügung stehen.

Zu Beginn unserer Untersuchung war uns eine für den gewünschten Zweck brauchbare Reaktion zum quantitativen Nachweis der Lävulose im Blute nicht bekannt. So war es die Aufgabe des einen von uns (*Radt*), eine für die Verhältnisse des Tierversuches brauchbare Methodik auszuarbeiten. Das gelang auch so weit, daß beweiskräftige Kaninchenversuche angestellt werden konnten. Erst nach Abschluß des größten Teiles der Versuche wurde von *van Creveld*[3] eine Methode beschrieben, die sich als vorteilhafter erwies. Mit dieser Methode prüfte *Kronenberger* die vorher erhaltenen Ergebnisse in einer neuen Versuchsreihe nach.

a) Wir gingen zunächst von der seit langem bekannten Resorcin-HCl-Reaktion (*Seliwanoff*sche Reaktion) zum Nachweis der Lävulose aus. Diese ergibt, wenn man Lävuloselösung mit der gleichen Menge 25%iger HCl und einigen Körnchen Resorcin 20 Sekunden kocht, einen roten Niederschlag oder rötlich-gelbliche Färbung, je nach der Menge der vorhandenen Lävulose. Der Hauptfehler dieser Reaktion, die bisher quantitativ noch nicht benutzt worden ist, ist der, daß sie nicht spezifisch ist, sondern der entstehende Farbstoff, das Oxymethylfurfurol, auch von anderen Kohlehydraten, z. B. auch der Glucose, wenn auch in viel geringeren Mengen gebildet wird. Quantitativ benutzten wir die *Seliwanoff*sche Reaktion in folgender Weise: Kocht man im Reagenzröhrchen von gleich lichter Weite 0,5 ccm der lävulosehaltigen Flüssigkeit mit 0,5 ccm 25%iger Salzsäure, die in 100 ccm 5 g Resorcin gelöst enthält, genau 10 Minuten im siedenden Wasserbad, so entspricht jeder in diesem Kubikzentimeter vorhandenen Lävulosemenge eine bestimmte Farbe. Dabei kommt es darauf an, daß stets mit gleichen Mengen Resorcin gearbeitet wird, da wir beweisen konnten, daß mit steigenden Resorcinmengen eine schwächere Färbung resultiert. Ferner ist von Wichtigkeit, im Wasserbad und nicht in der Flamme, wie in der Originalreaktion, zu kochen, da die resultierende Farbe durch die Menge des verdampften Wassers beeinflußt wird, was bei Erhitzen in der Bunsenflamme auch bei gleichen Zeiten verschieden ist. Die Menge der vorhandenen Lävulose läßt sich nun in doppelter Weise bestimmen. 1. Man kann sich mit Leichtigkeit nach Lävuloselösung mit bekanntem Lävulosegehalt Farbtabellen anlegen und mit diesen sofort nach Erkalten die Röhrchen vergleichen. Wir verzichten hier auf die Wiedergabe von solchen Tabellen. Standardröhrchen, die man immer wieder verwendet, sind nicht zu empfehlen, da die Farben sich schon nach kurzer Zeit ändern. 2. Man kann die Ausgangslösung in geometrischer Reihe verdünnen und bestimmen,

[1] Med. Klin. 1920, S. 1207 und Berl. Klin. Wochenschr. 1919, S. 941.
[2] Lancet 1921.
[3] Klin. Wochenschr. 1927, S. 697.



bis zum wievielten Röhrchen noch eine Färbung sichtbar bleibt. Da man die Grenzen der Reaktion kennt, ist es leicht, daraus die vorhandenen Lävulosemengen zu berechnen. In unseren Versuchen bedienten wir uns der Kontrolle wegen meist beider Möglichkeiten. Bei dieser Methodik läßt sich nicht ausschließen, ob nicht auch Traubenzucker an der Reaktion beteiligt ist. Wir konnten nachweisen, daß eine Traubenzuckerlösung denselben Farbton ergibt, wie eine Lävuloselösung, die den 30. Teil Zucker enthält. Dieser Fehler läßt sich dadurch ausschalten, daß man gleichzeitig den Reduktionswert der Lösung bestimmt und vergleicht.

Nicht unerwähnt soll bleiben, daß eine entsprechende Reaktion für Lävulose und Glucose auch ohne Resorcin allein mit 25%iger Salzsäure ausführbar ist, wenn man ungefähr dreimal solange im Wasserbad erhitzt. Doch gibt diese Reaktion keine besonderen Vorteile. Ebensowenig ist es nützlich, den Farbstoff mit Amylalkohol oder Essigäther auszuschütteln.

Die Reaktion zum Nachweis der Lävulose im Blute führten wir nun folgendermaßen aus: 2 ccm Blut werden mit 2 ccm Trichloressigsäure versetzt, gut durchgeschüttelt und filtriert. Mit je 0,5 ccm des Filtrats wird Reagenzglas Nr. 1 und 2 beschickt, nachdem schon vorher Reagenzglas Nr. 2 bis 8 mit je 0,5 ccm Aqua dest. gefüllt sind. Der Inhalt von Reagenzglas Nr. 2 wird gut durchmischt und davon 0,5 ccm in Reagenzglas Nr. 3 übertragen, wieder gemischt und davon 0,5 ccm in Reagenzglas Nr. 4 usw. bis 8. Von diesem werden 0,5 ccm weggeschüttet. Dann werden zu Reagenzglas Nr. 1 bis 8 je 0,5 ccm der Resorcin-HCl-Lösung zugesetzt, darauf 10 Minuten im siedenden Wasserbad gekocht. Ablesung erfolgt sofort nach Erkalten in der oben beschriebenen Weise. Der Nachteil der Methode besteht darin, daß schon normales Tier- oder Menschen-Nüchternblut eine gelbliche Färbung gibt, die eine gewisse Störung darstellt. Man kann jedoch diese Farbe bei der Auswertung der Resultate von der später auftretenden abziehen, um zu brauchbaren Ergebnissen zu kommen. In vielen Kontrollversuchen, in denen wir bekannte Lävulosemengen dem Blute zusetzten, hat sich dieses bestätigt. Es muß allerdings zugegeben werden, daß die von *van Creveld*[1] nach Abschluß eines großen Teiles unserer Versuche veröffentlichte Methode mit Diphenylamin unserer Resorcinreaktion überlegen ist.

b) Wir unterzogen diese Methode einer Prüfung, bevor wir auch mit ihr Tierversuche durchführten. Die Reaktion, die zuerst von *Ihl* und *Pechmann*[2] angegeben wurde, beruht darauf, daß Lävulose mit Diphenylamin und 25%iger HCl in der Hitze eine blaue Farbe ergibt. Wir richteten uns im wesentlichen in der Ausführung nach den Angaben *van Crevelds*. Das Blut wurde nach *Schenk* mit je 1 ccm 4%iger Salzsäure und 2 ccm 5%iger Sublimatlösung pro Kubikzentimeter Blut enteiweißt, das Filtrat nach Zusatz von 0,1 ccm 20%iger alkoholischer Diphenylaminlösung und 1 ccm 25%iger HCl 15 Minuten im Wasserbad erhitzt und nach dem Erkalten mit Amylalkohol ausgeschüttet. Durch die Enteiweißung wurde das Blut vierfach verdünnt. Für die Bestimmung der Lävulosemenge benutzten wir eine arithmetische Reihe von Vergleichsröhrchen, von denen das erste 1 mg-% Lävulose enthielt und die Lävulosemenge immer um den Faktor 1 mg anstieg, also 1 mg, 2 mg, 3 mg usw. Wir gingen dabei von

[1] Klin. Wochenschr. 1927, S. 697.

[2] Chem.-Ztg. 1885, S. 451.

einer 200 mg-%igen Standard-Lävuloselösung aus und verwandten mit gleich gutem Erfolg enteiweißtes Kaninchen- oder Hammelblut für die Vergleichsröhrchen. Da das zur Untersuchung bestimmte Blut als Folge der Enteiweißung wie gesagt vierfach verdünnt war, mußten wir stets mit 4 multiplizieren, und für unsere Bestimmungen standen uns also im Endergebnis zum Vergleich Lävulosegrößen von 4, 8, 12 mg-% usw. zur Verfügung. Gewöhnlich hatten wir acht Vergleichsröhrchen, konnten somit Lävulosemengen von 4 bis 32 mg-% feststellen. Näheres über methodische Einzelheiten siehe bei *van Creveld*. Wir hielten es nun für erforderlich, mit dieser Methode verschiedene Kontrollen anzustellen. Dabei fanden wir, daß gleiche Reihen mit bekanntem Lävulosegehalt gut übereinstimmende Farbtöne ergaben. Vergleich einer Lävulosereihe, der genau soviel Traubenzucker als der Kontrolle Lävulose zugesetzt war (Lösungsmittel enteiweißtes Blut), zeigte bei der Traubenzuckerreihe so gut wie keine Blaufärbung. Ein Diabetikerblut mit einem Blutzucker von 270 mg-% ließ einen schwachblauen Ton erkennen, der jedoch weit unterhalb des Farbtons von 4 mg-% Lävulose lag. Erwähnen müssen wir allerdings, daß wir zuweilen bei normalem Nüchternblut eine leicht blaue Farbe fanden, die jedoch sehr unerheblich war und uns praktisch nicht störte.

Die Tierversuche wurden im allgemeinen in beiden Versuchsreihen folgendermaßen angestellt. Die Kaninchen hatten 24 Stunden gehungert und erhielten 1 Stunde vor der Lävulosefütterung durch die Nase eine Magensonde als Dauersonde, wie es *Grunke* und *Hesse*[1] in einer Arbeit unseres Laboratoriums beschrieben haben. Der durch die Erregung bei der Sondeneinführung etwa angestiegene Blutzucker konnte dann bei der Beruhigung der Tiere in dieser Stunde wieder abfallen. Kurz vor der Fütterung bestimmten wir den Nüchternblutzucker. Das Blut wurde der Ohrvene entnommen, wir ließen es in kleine Schälchen tropfen, die zur Verhinderung der Gerinnung etwas Natrium citricum enthielten. Für jede Untersuchung genügten für Doppeluntersuchung je 40 bis 60 Tropfen. Den Blutzucker bestimmten wir nach *Hagedorn* und *Jensen*[2]. Gleich nach der Nüchternblutentnahme injizierten wir durch lie Sonde mittels Rekordspritze 5 bzw. 10 g Lävulose, gelöst in 10 bzw. 20 ccm Wasser, und entnahmen innerhalb der nächsten Stunde mehrfach Blut zur Untersuchung. In jeder Blutprobe wurden Lävulose und Gesamtreduktion festgestellt.

Auszug aus den Protokollen.

I. 23. Februar 1927. Kaninchen Nr. 2, grau, 1960 g. Fütterung 10 g Lävulose.

Nüchternblut	158 mg-%,	Lävulose —
3′ post coenam Blutz. . . .	157 mg-%,	„ —
35′ „ „ „ . . .	182 „	„ —

[1] Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **54**, 439, 1927.
[2] Diese Zeitschr. **135**, 46, 1923.



II. 2. März 1927. Kaninchen, weiß, Nr. 1. 2540 g. 10 g Lävulose.

	Blutz.	Lävulose
Nüchternblutz.	92 mg-%,	94 mg-%
2,5′ post coenam Blutz.	210,5 „	200 „
25′ „ „ „	302 „	210 „
35′ „ „ „	312 „	210 „
70′ „ „ „	322 „	220 „

III. 9. März 1927. Kaninchen Nr. 1, 10 g Lävulose.

	Blutz.	Lävulose
Nüchternblutz.	129 mg-%,	—
4,5′ post coenam Blutz.	138 „	—
30′ „ „ „	148 „	—
40′ „ „ „	190 „	—
65′ „ „ „	180 „	—

IV. 14. März 1927. Kaninchen Nr. 4. 10 g Lävulose.

	Blutz.	Lävulose
Nüchternblutz.	185 mg-%,	—
3′ post coenam Blutz.	200 „	Spuren
20′ „ „ „	225 „	30 mg-%
30′ „ „ „	234 „	40 „
60′ „ „ „	282 „	70 „

V. 18. März 1927. Kaninchen, weiß, Nr. 9. 6,0 g Lävulose.

	Blutz.	Lävulose
Nüchternblutz.	161 mg-%,	—
2′ post coenam Blutz.	164,5 „	—
20′ „ „ „	180,5 „	30 mg-%
30′ „ „ „	172 „	18 „
60′ „ „ „	169,5 „	Spuren

VI. 30. März 1927. Kaninchen, weiß, Nr. 1. 10 g Lävulose.

	Blutz.	Lävulose
Nüchternblutz.	129 mg-%,	—
3′ post coenam Blutz.	138 „	—
20′ „ „ „	150 „	30 mg-%
30′ „ „ „	158 „	30 „
60′ „ „ „	164,5 „	36 „

VII. 4. April 1927. Kaninchen, weiß, Nr. 9. 10 g Lävulose.

	Blutz.	Lävulose
Nüchternblutz.	152 mg-%,	—
2′ post coenam Blutz.	170 „	14 mg-%
20′ „ „ „	219,5 „	30 „
30′ „ „ „	228,5 „	40 „
60′ „ „ „	215 „	30 „

VIII. 4. April 1927. Kaninchen Nr. 4. 10,9 g Lävulose.

	Blutz.	Lävulose
Nüchternblutz.	163 mg-%,	—
2′ post coenam Blutz.	168 „	Spur
10′ „ „ „	181 „	20 mg-%
20′ „ „ „	186 „	25 „
30′ „ „ „	188 „	25 „
60′ „ „ „	191 „	20 „

Lävulosebestimmungen nach van Creveld.

IX. 27. Juni. Weiß-schwarzes Kaninchen, Gewicht 2630 g. Fütterung 5 g Lävulose.

Nüchternblutzucker	161 mg-%,	Lävulose	—
1,5′ post coenam Blutzucker	187 „	„	—
32′ „ „ „	210 „	„	+ unt. 4 mg-%
74′ „ „ „	203 „	„	+ unt. 4 „

(jedoch weniger als bei Bestimmung nach 32 Minuten)

X. 12. Juli. Schwarzes Kaninchen, Gewicht 2320 g. Fütterung 5 g Lävulose.

Nüchternblutzucker	142 mg-%,	Lävulose	— (nur Spur Blaufärbung)
3,5′ post coenam Blutzucker	168 „	„	—
33′ „ „ „	173 „	„	12—14 mg-%

XI. 13. Juli. Schwarzes Kaninchen, Gewicht 2350 g. Fütterung 5 g.

Nüchternblutzucker	137 mg-%,	Lävulose	—
5′ post coenam Blutzucker .	148 „	„	+ unt. 4 mg-%
36′ „ „ „ .	140 „	„	6 mg-%

XII. 19. Juli. Schwarzes Kaninchen (gleiches Tier wie in Versuch XI). Gewicht 2240 g. Fütterung 5 g Lävulose.

Nüchternblutzucker	103 mg-%,	Lävulose	—
4,5′ post coenam Blutzucker	133 „	„	—
33,5′ „ „ „	114 „	„	6 mg-%

XIII. 23. Juni. Kaninchen, Albino, *nicht nüchtern*. Fütterung 10 g Lävulose.

Nüchternblutzucker	131 mg-%,	Lävulose	—
3′ post coenam Blutzucker .	164 „	„	—
30′ „ „ „ .	222 „	„	16 mg-%

Besprechung der Protokolle.

Wir sehen aus unseren Versuchen, daß wir bei 11 von 13 Tieren im peripheren Blut Lävulose nach Verfütterung nachweisen konnten. Die Mengen schwanken, durchschnittlich fanden wir Werte zwischen 4 bis 40 mg-%, in einem Fall 70 mg-%, in einem anderen sogar den abnorm hohen Wert von 220 mg-%, ein Fall, in dem auch die Blutzuckerkurve abnorm hoch stieg (Versuch 2). In fünf Fällen ließ sich schon 2 bis 5 Minuten post coenam Lävulose im peripheren Blute nachweisen, meist in geringer Menge, nur in Fall 2 finden sich schon nach 2½ Minuten 94 mg-% Lävulose. Bis auf die beiden negativen Fällen finden wir nach 20 bis 30 Minuten immer Lävulose. Eine bestimmte Form der Lävulosekurve ist ebensowenig wie die der Blutzuckerkurve festzustellen. Die Höhe der Blutzuckerkurve schwankt beträchtlich. So sehen wir ein Ansteigen von 92 auf 322 mg-% (Fall 2) von 131 auf 222 mg-% (Fall 13) und in Fall 11 nur einen minimalen

Anstieg von 137 auf 148 mg-%. Ein Parallelismus zwischen Höhe der Gesamtreduktion und Lävulosehöhe liegt fast nie vor. Wir sehen einen Blutzuckeranstieg von 129 mg-% (Fall 3), ohne überhaupt Lävulose im Blute zu finden. Ähnliches zeigt Fall 1. Fall 12 dagegen zeigt einen Blutzuckeranstieg von 103 bis 133 mg-%, ohne Lävulose im Blute erkennen zu lassen, hingegen beim Abfall der Kurve auf 114 mg-% finden wir 6 mg-% Lävulose. Andererseits können wir im Fall 2, bei dem der Blutzucker von 92 auf 322 mg-% steigt, diese Hyperglykämie fast vollständig auf Lävulose beziehen, also analoges Verhalten von Blutzucker- und Lävulosekurve. Dieser Fall spricht eher für die Resorptionstheorie, während man die übrigen Fälle mehr zugunsten der Reiztheorie erklären kann.

Ergebnis.

Die Versuchsergebnisse dieser Arbeit lehren einmal, daß Lävulose schon so früh und ausreichend im Blute auftreten kann, daß in den betreffenden Fällen die Hyperglykämie durch die schnelle Resorption des Zuckers zu erklären ist. In der größeren Zahl der Fälle aber ist mit Sicherheit die blitzartig auftretende Hyperglykämie nicht durch die Resorption der Lävulose zu erklären, wenn man nicht unwahrscheinliche Hilfshypothesen aufstellen will. Es muß also nach Fütterung reflektorisch eine Hyperglykämie zustande kommen können.

Zur Prüfung der Treubschen Hypothese. II[1].

Von

L. Rosenthaler.

(Aus dem Pharmazeutischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 21. September 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Der zweite Satz der *Treub*schen Hypothese besagt, daß die Blausäure aus Kohlehydraten und Nitraten entsteht. Sind also genügende Mengen von Nitraten vorhanden, so muß die Menge der in den Pflanzen entstehenden Blausäure vom Kohlehydratstoffwechsel abhängig sein. Da aber die Bildung der Kohlehydrate von der Belichtung abhängig ist, so muß, wenn die *Treub*sche Hypothese richtig ist, auch ein Zusammenhang zwischen der Belichtung und der Menge der entstehenden Blausäure vorhanden sein. Über diese Frage liegen sowohl von *Treub* selbst als von anderen eine große Anzahl von Untersuchungen vor. Sie haben zu durchaus widersprechenden Ergebnissen geführt. Es war deshalb erforderlich, diese Frage nochmals zu prüfen. Die Versuche, über die im folgenden berichtet werden soll, wurden mit dem Kirschlorbeer (Prunus laurocerasus L.) angestellt, einem Strauch, der sich durch seinen starken Gehalt an Blausäure und reichliche Produktion an Blättern sehr gut zu solchen Versuchen eignet. Wenn die Forscher, die sich früher mit diesem Gegenstand beschäftigten, zu widersprechenden Ergebnissen gelangt sind, so weist dies darauf hin, daß ihre Methodik unvollkommen war. Die Fehler liegen hauptsächlich in zwei Richtungen: 1. in dem Verfahren zur Bestimmung der Blausäure; 2. in der Nichtberücksichtigung der Variation.

1. Zur Bestimmung der Blausäure wurde bisher immer so vorgegangen, daß das mehr oder minder zerkleinerte Material 12 bis 24 Stunden mit Wasser mazeriert und dann der Destillation unterworfen wurde. Eine völlige Erfassung der Blausäure ist auf diesem Wege nur dann möglich, wenn während der Dauer der Mazeration

---

[1] Siehe I. Mitteilung, diese Zeitschr. 134, 215, 1922.

alle Zellen genügend geschädigt sind, was, wie die Versuche zeigten[1], nicht zutrifft. Sicher erhält man alle Blausäure, wenn man zunächst alle Zellen durch Erhitzen tötet und nach dem Erkalten das nötige Enzym hinzusetzt. So ergab sich für die Bestimmung der Blausäure in Kirschlorbeerblättern das folgende Verfahren: Das rasch in mehrere Längsstreifen zerschnittene Blatt wird sofort nach dem Zerschneiden in das bereits in einem Becherglas zum Sieden gebrachte Wasser (etwa 200 ccm) untergetaucht. Nach 10 Minuten, während denen das Wasser fortwährend im Sieden erhalten wird, werden die Blätter fein so zerschnitten, daß die Bruchstücke sofort in das weiter siedende Wasser fallen. Man kocht noch 20 Minuten, führt nach dem Erkalten den Inhalt des Becherglases in einen Kolben über, spült mit Wasser nach, so daß die Flüssigkeitsmenge wieder 200 ccm beträgt, und setzt 0,01 g Emulsin hinzu. Nach zwölfstündiger Mazeration destilliert man die Blausäure ab und fängt in alkalischem Wasser auf.

Die Titration wurde mit n/50 Silbernitrat nach *Denigès* vorgenommen, wobei der Umschlag auf einen Tropfen zu erkennen ist, wenn das Destillat völlig klar ist[2]. Rechnet man einschließlich der Ablesungsfehler mit einem Gesamtfehler von $\pm$ 0,075 ccm, so müßte bei vergleichenden Versuchen ein Unterschied von mehr als 0,15 mg Blausäure zu erkennen sein. Dies entspricht bei einem Blattgewicht von 0,25, 0,5 und 1 g einem Unterschied von 0,06, 0,03 und 0,015 %.

2. Die Versuche, die bisher über den Einfluß des Lichtes auf blausäurehaltige Blätter angestellt wurden, wurden immer so ausgeführt, daß der Blausäuregehalt verdunkelter Blätter mit dem unverdunkelt gebliebener verglichen wurde. Dies Verfahren konnte, auch wenn die Blätter *eines* Strauches verglichen wurden, nur dann zu richtigen Ergebnissen führen, wenn die Anzahl der untersuchten Blätter eine sehr große gewesen wäre. Andernfalls ist mit den durch die chemische Variation bedingten Fehlern zu rechnen. Für Kirschlorbeerblätter habe ich beispielsweise an ausgewachsenen Blättern des Jahrgangs 1924 festgestellt, daß ihr Blausäuregehalt von 0,16 bis 0,35 % schwankte. Selbst bei den an demselben Stengel befindlichen Blättern kann man nicht mit Sicherheit auf denselben Blausäuregehalt rechnen; beispielsweise wurde bei je vier Blättern eines Stengels gefunden:

0,18, 0,22, 0,22, 0,25 % HCN,
0,31, 0,275, 0,35, 0,315 % HCN.

---

[1] Schweiz. Apotheker-Ztg. **62**, Nr. 47, 1924.

[2] Bisweilen wurden trübe Destillate erhalten, da gelegentlich ein weißer, in Wasser unlöslicher und auch in Weingeist nicht leicht löslicher Körper mit überdestilliert; dann bleibt nichts übrig, als nach Zusatz von Weinsäure nochmals zu destillieren, was aber auch nicht immer hilft.

Noch größer werden die Unterschiede, wenn die Blätter noch in der Entwicklung begriffen sind, dann zeigen die jüngeren Blätter einen größeren Prozentgehalt an Blausäure als die älteren. Dies geht aus folgender Übersicht hervor, aus der der Blausäuregehalt von vier aufeinander folgenden Blättern eines jungen Sprosses ersichtlich ist.

Gewicht	Blausäure	
g	absolut mg	%
0,030	0,39	1,3
0,094	0,6	0,64
0,438	2,2	0,51
0,651	2,9	0,45

Am sichersten kann man bei den Hälften ein und desselben Blattes darauf rechnen, daß sie denselben Gehalt an Blausäure besitzen. Dafür folgende Zahlen:

Erste Hälfte: 0,32, 0,20, 0,19, 0,21, 0,19, 0,22, 0,23, 0,34, 0,28, 0,24% HCN
Zweite „ 0,32, 0,20, 0,19, 0,23, 0,20, 0,22, 0,21, 0,35, 0,27, 0,25% HCN

Man stellt also die Versuche am besten so an, daß man die beiden Hälften eines Blattes miteinander vergleicht (*Blatthälftenverfahren*). Um von den während der Versuche eintretenden Gewichtsschwankungen unabhängig zu sein, schien es am besten, als rechnerische Grundlage die Blausäuremenge gleicher Volumina der zu vergleichenden Blatthälften zu wählen. Dies setzt voraus, daß sich diese Volumina innerhalb der Versuchsdauer nicht ändern. Da die Versuche mit wenigen besonders aufgeführten Ausnahmen mit ausgewachsenen Blättern des zweiten Vegetationsjahres vorgenommen wurden, die Blätter außerdem kein Dickenwachstum besitzen, so kann mit der Konstanz der Volumina gerechnet werden. Da damit gerechnet werden durfte, daß die beiden Hälften eines Blattes gleiche Dicke besitzen, so liefen die Versuche darauf hinaus, die Menge der Blausäure in gleich großen Ausschnitten der zu vergleichenden Blatthälften zu bestimmen. Diese Vereinfachung war gerechtfertigt, da, wie die folgenden Beispiele zeigen, gleiche Ausschnitte der Hälften eines Blattes — von unvermeidlichen Ausnahmen abgesehen — innerhalb der Versuchsfehler die gleiche Blausäuremenge enthalten.

In 20 qcm enthielten

Erste Blatthälfte: 1,5, 1,4, 1,4, 1,6, 1,05, 0,8, 1,25, 1,1, 1,45, 1,6 mg HCN
Zweite „ 1,6, 1,35, 1,2, 1,6, 1,05, 0,8, 1,2, 1,1, 1,45, 1,5 mg HCN

In allen Fällen, in denen beide Blatthälften zu verschiedenen Zeiten entnommen wurden, wurde zunächst die eine Blatthälfte abgeschnitten und in der angegebenen Weise untersucht. Die zweite

I. Versuche über den Einfluß der Tageszeit.

Morgens → Abends

Datum 1927	Blattfläche qcm	HCN morgens mg	HCN abends mg
	a) Ohne Ringelung.		
24. VI.	18,6	0,75	0,75
	22,2	0,75	0,85
	16,7	0,65	0,7
24. VII.	24	1,15	1,2
	20	1,05	1,05
	20	1,0	1,05
	20	1,0	0,95
6. VIII.	27	1,25	1,25
	20	1,05	1,05
	27	1,7	1,7
	20	1,25	1,3
	b) Mit Ringelung.		
19. VII.	20	1,1	1,25
	24	1,6	1,5
	27	1,6	1,75
	27	1,5	1,4
4. VIII.	24	1,25	1,25
	20	1,25	1,25
	27	1,2	1,25
	24	1,3	1,3
5. VIII.	24	1,5	1,5
	20	1,2	1,2
	20	1,35	1,3
	20	1,25	1,05
20. VII.	27	1,6	1,6
	27	1,95	1,7
	27	1,75	1,5
	27	1,5	1,5

Abends → Morgens

Datum	Blattfläche qcm	HCN morgens mg	HCN abends mg
	a) Ohne Ringelung.		
26. VI.	16,5	0,6	0,55
	24,9	1,05	1,0
	24,15	1,2	1,2
6. VII.	24	1,15	0,95
	21	0,95	1,05
	20	0,85	0,85
	20	0,75	0,75
24. VII.	20	1,4	1,4
	24	1,5	1,55
	20	1,15	1,3
	20	1,3	1,3
28. VII.	20	1,0	1,0
	24	1,4	1,4
	24	1,25	1,15
	20	1,0	1,0
31. VII.	20	1,2	0,95
	20	0,9	0,75
	20	0,9	0,9
1. VIII.	20	1,25	1,25
	24	1,5	1,5
	27	1,5	1,5
	27	1,4	1,5
2. VIII.	24	1,9	1,9
	20	1,5	1,55
	24	1,7	1,65
	27	1,8	1,8
	b) Mit Ringelung.		
4. VII.	20	1,05	1,05
	20	1,05	1,05
	21	1,4	1,4
	20	1,1	1,15
17. VII.	17,5	1,0	1,0
	20	1,2	1,2
	20	1,1	1,15
	20	1,05	1,05
25. VII.	20	1,15	1,05
	24	1,4	1,3
	20	1,0	1,0
26. VII.	20	1,15	1,15
	20	1,25	1,3
	20	1,1	1,05
	20	1,1	1,05
27. VII.	27	1,75	1,75
	27	1,75	1,7
	27	1,55	1,5

II. Verdunkelungsversuche[1].

Versuchszeit 1927	Dauer Tage	Fläche qcm	Blausäure der unverdunkelten Fläche mg	Blausäure der verdunkelten Fläche mg
a) Ohne Ringelung.				
26. VI. bis 3. VII. . . .	7	27	1,15	1,2
26. VI. „ 9. VII. . . .	13	24	1,1	1,1
26. VI. „ 16. VII. . . .	20	20	1,0	0,95
		20	0,85	0,9
26. VI. „ 24. VII. . . .	28	20	1,2	1,15
		20	1,15	1,15
26. VI. „ 31. VII. . . .	35	24	1,15	1,15
		24	1,25	1,25
26. VI. „ 5. VIII. . . .	40	24	1,3	1,25
*7. VIII. „ 6. IX. . . .	30	20	1,25	1,35
*3. VIII. „ 5. IX. . . .	33	20	1,5	1,55
		20	1,2	1,2
*3. VIII. „ 7. IX. . . .	35	20	1,95	1,6
		15	1,5	1,5
b) Mit Ringelung.				
26. VI. bis 9. VII. . . .	13	24	1,2	1,2
26. VI. „ 16. VII. . . .	20	20	1,15	1,15
		20	0,95	1,0
26. VI. „ 24. VII. . . .	28	20	1,1	1,25
		24	1,35	1,15
26. VI. „ 31. VII. . . .	35	24	1,5	1,5
		24	1,5	1,5
*7. VIII. „ 9. IX. . . .	33	18	0,9	0,95
*7. VIII. „ 10. IX. . . .	34	20	1,0	1,05
*3. VIII. „ 5. IX. . . .	33	18	1,5	1,55
		20	1,6	1,55
*3. VIII. „ 6. IX. . . .	34	20	1,6	1,35
*3. VIII. „ 7. IX. . . .	35	20	1,3	1,3
*5. VIII. „ 6. IX. . . .	32	20	1.5	1,35
		20	1,7	1,6
*5. VIII. „ 9. IX. . . .	35	20	1,05	1,0
*5. VIII. „ 10. IX. . . .	36	20	1.05	1,05

Blatthälfte blieb samt den Mittelnerven bis zur Beendigung des Versuchs am Stengel und wurde dann (ohne den Mittelnerven) in derselben Weise untersucht.

Ist, wie es die *Treub*sche Hypothese verlangt, das Licht von Einfluß auf den Blausäuregehalt, so ist analog den Verhältnissen bei den Kohlehydraten zu erwarten, daß im Laufe von 24 Stunden Änderungen im Blausäuregehalt eintreten. Um darauf zu prüfen, wurde eine Reihe

[1] Bei den mit * versehenen Versuchen wurde die unverdunkelte Hälfte zu Beginn des Versuchs analysiert, bei den anderen beide Hälften nach dessen Beendigung.



III. Dauerversuche.

Versuchszeit 1927	Dauer Tage	Fläche qcm	Blausäure bei Beginn mg	Blausäure am Ende mg
		a) Ohne Ringelung.		
28. VI. bis 28. VII. . . .	30	21	1,25	1,3
		18	1,05	1,3
28. VI. „ 3. VIII. . . .	36	18	0,95	1,2
		18	0,9	1,15
29. VI. „ 6. IX. . . .	70	20	0,95	1,4
		18	1,1	1,3
30. VI. „ 6. IX. . . .	69	20	0,95	1,35
		20	1,0	1,3
30. VI. „ 7. IX. . . .	70	20	1,1	1,5
		20	0,95	1,5
3. VII. „ 10. IX. . . .	69	20	1,1	1,5
		21	1,2	1,3
5. VII. „ 10. IX. . . .	67	20	1,05	1,15
		20	0,9	1,1
		20	1,15	1,2
7. VII. „ 8. IX. . . .	63	20	1,35	1,4
		21	1,2	1,25
		24	1,25	1,25
12. VII. „ 8. IX. . . .	58	20	1,3	1,25
		20	1,15	1,15
		24	1,3	1,3
		b) Mit Ringelung.		
28. VI. bis 2. VIII. . . .	35	18	0,9	1,15
		24	1,15	1,35
28. VI. „ 3. VIII. . . .	36	20	0,85	1,35
		18	1,1	1,15
30. VI. „ 5. VIII. . . .	38	18	0,85	1,05
		18	1,2	1,4
		18	1,0	1,4
30. VI. „ 8. IX. . . .	71	21	1,25	1,7
		21	1,25	1,7
		21	1,1	1,35
		21	1,2	1,5
3. VII. „ 5. IX. . . .	64	20	1,15	1,4
		20	1,1	1,5
5. VII. „ 8. IX. . . .	65	20	1,25	1,25
		24	1,40	1,45
7. VII. „ 9. VIII. . . .	64	20	1,6	1,8
		20	1,35	1,7
		20	1,2	1,35
12. VII. „ 10. IX. . . .	60	24	1,2	1,6
		24	1,35	1,5
		27	1,65	2,2
		24	1,8	2,1
*8. VIII.[1] „ 5. IX. . . .	36	20	0,3	0
*8. VIII. „ 6. IX. . . .	37	24	1,05	0,4
		20	1,2	0,3
*8. VIII. „ 7. IX. . . .	38	20	0,4	0,3
		20	0,75	0
*8. VIII. „ 8. IX. . . .	39	20	0,75	0

[1] * = dreijährige, im Absterben begriffene Blätter.

von Versuchen so ausgeführt, daß die eine Blatthälfte morgens um 5 Uhr, die andere abends um 7 Uhr entnommen wurde, und umgekehrt.

Nach der *Treub*schen Hypothese war ferner zu erwarten, daß bei Kirschlorbeerblättern, deren *eine* Hälfte verdunkelt wurde, diese nach einiger Zeit weniger Blausäure enthielt, als die andere. Zur Ausführung dieser Versuche wurden an einer Anzahl von Blättern Ober- und Unterseite einer Blatthälfte mit Hilfe von Heften mit schwarzem Glanzpapier (schwarze Seite nach außen) zugedeckt, in welchem mit einer Nadel feine Durchbohrungen zur Erleichterung des Gasaustauschs angebracht waren.

Bei allen diesen Versuchen war noch damit zu rechnen, daß Unterschiede im Blausäuregehalt nur deshalb nicht festgestellt werden konnten, weil die Blausäure mit den Assimilaten abfloß. Um dem zu begegnen, wurden stets auch Ringelungsversuche ausgeführt, d. h. an den Stengeln wurde eine kleine Zone der Rinde entfernt, während der Holzkörper intakt blieb. Solche Ringelungsversuche wurden auch bei den „Dauerversuchen" ausgeführt, bei denen die zweite Blatthälfte mehrere Wochen nach der ersten untersucht wurde. Denn auch bei diesen Dauerversuchen war, zum mindesten, wenn sie in der guten Jahreszeit ausgeführt wurden, nach der *Treub*schen Hypothese ein Ansteigen der Blausäure zu erwarten, wenn ein etwaiger Abtransport der Blausäure verhindert wurde, immer vorausgesetzt — dies gilt auch für das Vorhergehende —, daß die entstandene Blausäure nicht sofort wieder quantitativ umgesetzt wird.

Erörterung der Ergebnisse.

Aus den Tabellen geht folgendes hervor:

1. Von morgens bis abends und umgekehrt ist keine Änderung der Blausäuremenge nachweisbar, gleichgültig, ob geringelt wurde oder nicht. Vgl. dazu unter 3.

2. Die Verdunkelung beeinflußt die Blausäuremenge nicht; auch hier ändert die Ringelung nichts an dem Ergebnis.

3. In den Sommermonaten ist bei längerer Dauer der Versuche bei den zum größten Teil der Versuche benutzten Blättern der zweiten Vegetationsperiode eine geringe Zunahme der Blausäuremenge[1] fest-

[1] Die Unterschiede fallen immerhin in die Wagschale, wenn man bedenkt, daß das Molekulargewicht des Prulaurasins, des tatsächlich gebildeten Körpers, mehr als zehnmal so groß ist als das der Blausäure (295,15 : 27,02) und daß nur etwa zwei Drittel des Blattes untersucht wurden.



zustellen. Die Geringfügigkeit der Zunahme erklärt es, daß bei den eintägigen Versuchen (siehe 1.) eine Änderung der Blausäuremenge nicht nachzuweisen war. Die geringelten Blätter zeigen auch hier keinen durchgreifenden Unterschied gegenüber den ungeringelten.

Von diesen Befunden lassen sich nur die Dauerversuche mit der *Treub*schen Hypothese in Einklang bringen, die anderen, insbesondere die Verdunkelungsversuche stimmen nicht mit der Hypothese und den aus ihr von *Treub* gezogenen Schlußfolgerungen überein. Will man nicht die von *Treub* selbst nicht gemachte und nahezu jede Nachprüfung ausschließende Annahme machen, daß die Blausäure jeweils ebenso rasch umgewandelt als gebildet wird[1], so genügen die in dieser Abhandlung mitgeteilten Ergebnisse, die *Treub*sche Hypothese zu verwerfen, auch wenn man die bereits in meiner ersten Mitteilung festgestellten, gegen sie sprechenden Tatsachen nicht anerkennen will. Dazu kommt, daß nach *Treubs* eigener Meinung seine Hypothese nur die Bildung der Blausäure in den Blättern erklären will, andere Bildungsweisen der Blausäure, also etwa die bei der Keimung von Samen, nicht umfaßt.

Eine weitere Schwäche der *Treub*schen Hypothese ist es, die Tatsache völlig unberücksichtigt zu lassen, daß die Blausäure als solche so gut wie gar nicht im Pflanzenreich vorkommt, sondern daß sie an andere Stoffe gebunden ist.

Demgegenüber darf wohl erneut darauf hingewiesen werden, daß man, im Gegensatz zur *Treub*schen Hypothese, nach der die Blausäure ein direktes Zwischenglied der Eiweißbildung ist, zu einer Erklärung der meisten sichergestellten Tatsachen kommt, wenn man die Bildung der Blausäure und der Blausäureverbindungen als einen Seitenweg des Eiweißstoffwechsels betrachtet, wie ich dies schon in meiner ersten Mitteilung[2] dargelegt habe. Man wird also bei denjenigen Pflanzen, die die Eigenschaft haben, Blausäure zu bilden, dies in besonders hohem Maße erwarten dürfen, wenn Eiweiß oder vielleicht auch nur Eiweiß bestimmter Art neu gebildet wird. Dies ist unter anderem der Fall bei der Reife und dem Auskeimen von Samen, dem Austreiben von Knospen und starker Zuführung von Stickstoffverbindungen. Über die Verhältnisse beim Austreiben von Knospen des Kirschlorbeers unterrichten die nächsten Tabellen.

---

[1] Die in den Dauerversuchen festgestellte Zunahme würde dann eine darüber hinausgehende Dauerform darstellen.

[2] l. c., S. 223.



IV. Dauerversuche an jungen Sprossen.

Dauer des Versuchs 1925	Erste Blatthälfte			Zweite Blatthälfte		
	Gewicht g	Blausäure absolut mg	Blausäure %	Gewicht g	Blausäure absolut mg	Blausäure %
13. VIII. bis 10. IX.	0,065	0,52	0,79	0,865	2,3	0,27
	0,077	0,6	0,78	0,895	2,1	0,23
	0,105	0,52	1,96	0,689	1,68	0,24
19. VIII. bis 23. IX.	0,053	0,3	0,57	0,490	1,5	0,32
	0,183	0,8	0,42	0,565	1,8	0,33
	0,180	0,8	0,42	0,553	1,3	0,26

Die Versuche zeigen, daß bei der Entwicklung der jungen Blättchen zwar der Prozentgehalt an Blausäure abnimmt, daß andererseits aber der absolute Gehalt an Blausäure auf das Fünffache der ursprünglichen Menge steigen kann. Dabei besteht immerhin die Möglichkeit, daß dieses Mehr an Blausäure nicht in den Blättchen selbst erzeugt, sondern von unten her zugeführt wird. Um darüber zu entscheiden, stellte ich folgende Versuche an. Im Frühjahr wurden an einer Anzahl knospentragender Zweige alle Blätter bis auf die vier der Knospe unmittelbar benachbarten entfernt. Die eine Reihe der Blatthälften wurde sofort, die andere nach der Entfaltung der Knospen untersucht. Zur Kontrolle wurde eine analoge Reihe von Versuchen mit Zweigen durchgeführt, denen die Knospen belassen wurden. In den folgenden Tabellen sind die zusammengehörigen vier Blätter in ihrer natürlichen Reihenfolge nach ihrem Abstand von der Sproßspitze aufgeführt. Die Versuche betrafen Zweige mit Blatt- und Blütenknospen.

V. Versuche an Zweigen mit entfernter Blütenknospe[1].

Dauer des Versuchs 1926	Erste Blatthälfte				Zweite Blatthälfte			
	Gewicht g	Trockenrückstand %	HCN-Gehalt der Blatthälften %	HCN-Gehalt des Trockenrückstands %	Gewicht g	Trockenrückstand %	HCN-Gehalt der Blatthälften %	HCN-Gehalt des Trockenrückstands %
28. II bis 6. IV.	0,670	40,35	0,30	0,74	0,586	41,91	0,32	0,76
	0,294	41,66	0,33	0,80	0,347	42,73	0,30	0,69
	0,692	39,10	0,28	0,71	0,877	40,10	0,28	0,70
	0,701	37,50	0,29	0,78	0,594	39,04	0,29	0,75
27. II. bis 26. IV.	0,446	39,58	0,37	0,93	0,523	42,47	0,32	0,76
	0,761	39,08	0,34	0,87	0,702	43,48	0,37	0,86
	0,698	39,66	0,33	0,82	0,953	41,71	0,38	0,91
	0,819	41,67	0,35	0,83	0,858	43,18	0,34	0,79

[1] Bei diesen Versuchen, die früher ausgeführt wurden als die der Tabellen I bis III, wurden die Ergebnisse in der früher üblichen Weise auf Gewichtsprozente berechnet; außerdem wurde, um die Ergebnisse auf den Trockenrückstand berechnen zu können, auch dieser bestimmt.

Dauer des Versuchs	Erste Blatthälfte				Zweite Blatthälfte			
	Gewicht	Trocken-rück-stand	HCN-Gehalt der Blatt-hälften	HCN-Gehalt des Trocken-rückstands	Gewicht	Trocken-rück-stand	HCN-Gehalt der Blatt-hälften	HCN-Gehalt des Trocken-rückstands
1926	g	%	%	%	g	%	%	%
VI. Versuche an Zweigen mit belassener Blütenknospe.								
25. II. bis 6. IV.	0,741	40,48	0,29	0,71	0,744	44,55	0,30	0,67
	0,669	41,67	0,29	0,69	0,630	43,10	0,30	0,71
	0,756	40,26	0,29	0,73	0,750	42,00	0,30	0,71
	0,716	42,27	0,28	0,66	0,773	42,37	0,32	0,75
26. II. bis 26. IV.	0,721	42,50	0,36	0,80	0,933	42,29	0,30	0,70
	0,937	44,20	0,34	0,77	0,860	44,14	0,33	0,74
	0,786	42,78	0,32	0,74	1,023	43,85	0,30	0,69
	0,994	42,53	0,32	0,74	0,932	44,81	0,33	0,78
VII. Versuche an Zweigen mit entfernter Blattknospe.								
20. II. bis 30. IV.	0,674	43,82	0,19	0,42	0,641	42,75	0,19	0,44
	0,597	42,48	0,19	0,46	0,684	42,77	0,21	0,49
	0,429	43,70	0,21	0,47	0,394	42,47	0,19	0,44
	0,704	44,79	0,18	0,41	0,685	43,72	0,16	0,36
24. II. bis 1. V.	0,617	42,23	0,22	0,51	0,650	40,80	0,22	0,54
	0,639	38,38	0,21	0,54	0,615	41,56	0,20	0,49
	0,684	40,35	0,17	0,42	0,792	41,42	0,18	0,43
	0,522	35,81	0,20	0,57	0,553	40,66	0,20	0,56
2. III. bis 23. IV.	0,451	48,67	0,23	0,47	0,504	40,80	0,22	0,45
	0,544	44,32	0,21	0,48	0,659	43,64	0,23	0,53
	0,641	40,78	0,22	0,54	0,625	41,87	0,21	0,51
	0,719	45,60	0,21	0,46	0,876	43,05	0,17	0,39
VIII. Versuche an Zweigen mit belassener Blattknospe.								
2. III. bis 28. IV.	0,634	43,82	0,23	0,53	0,592	42,86	0,22	0,51
	0,628	42,21	0,22	0,52	0,892	43,78	0,19	0,43
	0,732	44,95	0,21	0,46	0,641	43,30	0,15	0,35
	0,363	41,18	0,23	0,57	0,325	42,97	0,18	0,41
3. III. bis 24. IV.	0,418	40,15	0,27	0,66	0,435	41,84	0,26	0,61
	0,602	41,97	0,24	0,56	0,712	41,08	0,22	0,54
	0,804	47,32	0,23	0,49	0,810	46,23	0,23	0,50
	0,606	40,87	0,26	0,65	0,563	42,47	0,28	0,68
3. III. bis 1. V.	0,384	41,14	0,22	0,54	0,403	41,60	0,22	0,54
	0,518	44,69	0,22	0,50	0,710	46,45	0,22	0,47
	0,720	45,35	0,18	0,40	0,916	45,45	0,16	0,36
	0,780	47,40	0,23	0,49	0,680	45,41	0,20	0,43

Die Versuche bieten keinen Anhaltspunkt dafür, daß Blausäure aus den Blättern in die in der Entfaltung begriffenen Blatt- oder Blütenknospen eingetreten ist. Wohl sind in der Tabelle VIII einige Abnahmen zu beobachten, aber solche fehlen auch in Tabelle VII nicht; andererseits reicht die Abnahme der ersten Versuchsreihe von Tabelle VIII, obwohl sie die größte ist, kaum aus, um den zehnten Teil der Zunahme an Blausäure zu decken, welche mit der Entfaltung der Knospen und dem Wachstum der jungen Blätter eintritt.

Schließlich haben noch Versuche, bei denen man die Knospen innerhalb einer Hülle aus schwarzem Papier austreiben ließ, gezeigt, daß die entwickelten jungen Blätter stark blausäurehaltig waren. Beispielsweise hatte ein solches 0,225 g wiegendes Blättchen einen Blausäuregehalt von 0,41 %. Man darf also aus diesen Versuchen den Schluß ziehen, daß die Zunahme der Blausäure, die während der Entfaltung der Knospen eintritt, ein innerer, wahrscheinlich mit der Eiweißbildung in Zusammenhang stehender Vorgang ist.

Daß überschüssiger Stickstoff bei den Blausäurepflanzen in Form von Blausäureverbindungen niedergelegt wird, zeigen auch die folgenden Düngungsversuche, die mit Sambucus nigra L. durchgeführt wurden. Sie sollten ursprünglich ein Analogon zu einem früher ausgeführten Versuch[1] bilden, bei dem ich Tyrosin in Sorghum nigrum einspritzte. Solche Einspritzungen lassen sich aber aus technischen Gründen bei Sambucus nigra nicht machen. Ich habe deshalb junge, ungefähr gleich große Pflänzchen mit den Versuchsstoffen gedüngt[2], und zwar mit n/100 (auf N berechnet) Lösungen von Asparagin, Glykokoll, Harnstoff, Phenylalanin und Tyrosin. Die Pflänzchen, ungefähr gleich große Sämlinge, wurden in völlig gleicher Weise von Anfang April bis Ende Juni mit je zwei Liter der Lösung begossen. Zur Analyse wurden alle grünen Teile verwendet. Stengel und Blätter wurden getrennt untersucht.

IX. Düngungsversuche mit Sambucus nigra L.

Gedüngt mit	Stengel			Blätter			Gesamt-Blausäure
	Gewicht	Blausäure		Gewicht	Blausäure		
	g	mg	%	g	mg	%	mg
I.	0,667	Spuren	Spuren	1,741	0,3	0,18	0,3
II. Asparagin .	3,711	0,7	0,2	9,891	2,7	0,27	3,4
III. Glykokoll .	1,977	0,36	0,18	6,300	2,2	0,35	2,56
IV. Harnstoff . .	1,550	0,3	0,2	3,930	0,7	0,19	1,0
V. Phenylalanin	2,580	0,57	0,22	5,398	1,45	0,27	2,07
VI. Tyrosin . .	3,605	0,68	0,19	7,800	2,15	0,29	2,88

[1] Diese Zeitschr. **134**, 215, 1923.

[2] Düngungsversuche lassen sich natürlich nicht mit Einspritzversuchen auf eine Stufe stellen, weil bei ersteren die Bodenbakterien mitwirken.



Das Ergebnis zeigt Tabelle IX, die zum Vergleich auch die mit einer nicht gedüngten Pflanze erhaltenen Resultate enthält.

Die Abb. 1 läßt das Aussehen der Pflanzen erkennen; sie zeigt allerdings nur undeutlich, daß bei einigen Pflänzchen die Blätter der unteren Regionen zum Teil ihre Form verändert haben. An Stelle der normalen eiförmig-länglichen Blätter mit ausgezogener Spitze traten rundliche Blätter ohne Spitze auf.



Abb. 1. Sambucus nigra L.
I Blinder Versuch. II bis VI gedüngt: II mit Asparagin, III mit Glykokoll, IV mit Harnstoff, V mit Phenylalanin, VI mit Tyrosin.

Zur völligen Beurteilung der Blausäurefrage ist es noch nötig, einen Blick auf das Schicksal der entstandenen Blausäure zu werfen. Mit Sicherheit ist festgestellt, daß in 3 Jahre alten Kirschlorbeerblättern der Gehalt an Blausäure zurückgeht und daß die abfallenden Blätter entweder keine Blausäure oder nur Spuren davon enthalten. Die mit * bezeichneten Versuche der Tabelle III zeigen, daß dieser Rückgang der Blausäure durch Ringelung nicht verhindert wird. Die Blausäure wird also beim Absterben der Blätter verbraucht. Sie ist also auch kein Exkret.

Zusammenfassung.

1. Versuche mit Kirschlorbeerblättern ergaben keinen Zusammenhang zwischen Licht und Blausäurebildung und damit keine Bestätigung des zweiten Satzes der *Treub*schen Hypothese.

2. Die Zunahme der Blausäure, die während der Entfaltung der Blattknospen in den jungen Blättern des Kirschlorbeers eintritt, ist ein innerer, wahrscheinlich mit der Eiweißbildung in Zusammenhang stehender Vorgang.

3. Die Blausäure der Kirschlorbeerblätter ist kein Exkret.

4. Düngung von Sambucus nigra mit Aminosäuren ergab eine Vermehrung der Blausäure.

5. Die wahrscheinlichste Erklärung der Entstehung der Blausäure in den meisten Pflanzen ist die folgende: Blausäureverbindungen entstehen in den Blausäurepflanzen, wenn in ihnen mehr einfache Stickstoffverbindungen, in erster Linie Aminosäuren, vorhanden sind, als sie zu komplizierteren Stoffen, insbesondere bestimmten Eiweißstoffen verarbeiten können. Die Blausäureverbindungen entstehen demgemäß auf Seitenwegen des Stickstoff-, insbesondere des Eiweißstoffwechsels.

Herrn Prof. Dr. *E. Fischer*-Bern danke ich auch an dieser Stelle dafür, daß er mir die Kirschlorbeersträucher des Berner botanischen Gartens für meine Versuche zur Verfügung stellte.

Einwirkung des Bacteriums lactis aerogenes und des Bacteriums coli auf Hexose-mono-phosphorsäure.

Von

Naomi Kageura.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 5. Oktober 1927.)

Bisher ist die Rolle der Phosphorylierung für den Prozeß des Zuckerabbaus nicht restlos geklärt. Die Ansicht, daß eine Hexose-di-phosphorsäure das obligatorische Durchgangsprodukt bei den desmolytischen Kohlenhydrat-umsetzungen darstelle, ist ursprünglich von *A. Harden*[1] und seiner Schule, ferner von *H. v. Euler*[2] und seinen Mitarbeitern sowie anderen vertreten. Die Schwierigkeiten, die für die Annahme dieser Anschauung bestanden, wurzelten darin, daß, soweit die Hefe in Betracht kommt, Hexose-di-phosphorsäure nur mit einzelnen Hefesorten erhalten werden kann und daß sie weder von den normalen lebenden Erregern gebildet noch vergoren wird. Deshalb haben *C. Neuberg* und seine Mitarbeiter[3] schon frühzeitig Bedenken gegen die Meinung geltend gemacht, daß der Hexose-di-phosphorsäure die ausschlaggebende Bedeutung beizumessen sei; sie haben vielmehr in einer Anhäufung dieser Substanz den Ausdruck abnormen Geschehens erblickt, d. h. die Wirkung einer unnatürlich großen, künstlich zugefügten Menge phosphorsaurer Salze sowie den Effekt unkoordinierter Enzymkräfte, die sich infolge Schädigung der Hefenzellen unter den besonderen Entstehungsbedingungen des Zymo-di-phosphats entfalten.

Die Bedenken gegen die Bewertung des Hexose-di-phosphorsäureesters als einer zwangsmäßig durchlaufenen Zwischenstufe wurden dadurch erhöht, daß auch die zellfreie Vergärung dieses Stoffes oder seine Vergärung mit durchlässig gemachten Hefenpräparaten, also

---

[1] *A. Harden*, Alcoholic Fermentation, 1923.

[2] *H. v. Euler* und *P. Lindner*, Chemie der Hefe usw. 1915.

[3] *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **78**, 238, 1916; **83**, 244, 1917; **103**, 320, 1920; „Der Zuckerumsatz der Zelle“ in Oppenheimers Handb. d. Biochem. 2. Aufl., IX, S. 454, 1924.

die Vergärung nach Beseitigung der Permeabilitätshindernisse, langsamer geschieht als die des gewöhnlichen nicht phosphorylierten Zuckers. Dieses Verhalten verdient deshalb besondere Beachtung, weil für den Zucker des Hexose-di-phosphats die labile Form eines am-Kohlenhydrates angenommen wird, für das man eine größere Umsetzungsgeschwindigkeit erwarten sollte.

Nach *R. Robisons*[1] Feststellung, daß die Hefe auch einen Hexose-mono-phosphorsäure-ester erzeugen kann, ist diese Substanz mehr in den Vordergrund des Interesses gerückt, und dies um so stärker, als *C. Neuberg* und *J. Leibowitz*[2] Bedingungen ausfindig machten, unter denen der Mono-phosphorsäure-ester in erheblicher, jedenfalls in größerer Ausbeute als das Zymo-di-phosphat entsteht. Wir wissen zwar nichts über seine Bildung durch normal beschaffene Hefe, aber immerhin wird er durch unversehrte lebende Hefezellen vergoren; dabei bleibt es freilich auffallend, daß nach *C. Neuberg* und *M. Kobel*[3] die Schnelligkeit des Zerfalls geringer ist als die des nicht mit einer Phosphorsäuregruppe beladenen Zuckers.

Die Ähnlichkeiten, die zwischen alkoholischer Vergärung und glykolytischem Abbau des Zuckers zu Milchsäure bestehen, haben dazu geführt, auch für die bakterielle Milchsäure-gärung die Bildung von Zucker-phosphorsäure-derivaten als Bedingung zu postulieren. Die Angaben darüber sind nicht ohne Widerspruch. *A. J. Virtanen*[4] hat sich mit diesem Gegenstand beschäftigt und zunächst mitgeteilt, daß der typische Milchsäurebildner Str. lactis weder phosphoryliert noch Zymophosphat zu zerlegen imstande sei. Später ist der Autor zu der Ansicht gelangt, daß eine Phosphat-bindung durch diesen Mikroorganismus und das Bacterium casei doch erfolge; die Phosphat-verminderung erreichte freilich nur 0,3 bis 7,4% bzw. 9,1 bis 33,7%. Eine Feststellung, ob gegebenenfalls hier der Mono-ester oder Di-ester in Erscheinung tritt, scheint nicht vorzuliegen.

Es erhob sich nun die Frage: Kann überhaupt der erwähnte Hexose-mono-phosphorsäure-ester durch Mikroorganismen in ***Milchsäure*** übergeführt werden? Diese Frage, die wegen der erwähnten angeblichen Unangreifbarkeit des Zymo-di-phosphats der Untersuchung bedurfte,

[1] *R. Robison*, Biochem. Journ. **16**, 809, 1922.

[2] *C. Neuberg* und *J. Leibowitz*, diese Zeitschr. **184**, 489, 1927.

[3] *C. Neuberg* und *M. Kobel*, ebendaselbst **166**, 488, 1925; **174**, 480, 1926; **179**, 451, 1926.

[4] *A. J. Virtanen*, H. **134**, 300, 1924; H. **138**, 136, 1924; **143**, 75, 1925; im B. aerogenes haben *K. Myrbäck* und *H. v. Euler* (B. **57**, 1075, 1924) auch keine Cozymase nachweisen können, die für die Phosphorylierung unerläßlich zu sein scheint.

prüfte ich mit zwei Bakterienarten, dem *Bacterium coli* und dem *Bacterium lactis aerogenes.* Verwendet habe ich diese beiden Bakterien, weil sie in neuer Zeit im Gegensatz zu früheren Anschauungen als gute und anspruchslose Milchsäurebildner erkannt worden sind. Man wußte, daß diese Erreger unter Umständen Milchsäure hervorbringen, aber erst *C. Neuberg* und *G. Gorr*[1] sowie *G. Goto*[2] haben den eindeutigen Beweis geliefert, daß der auch von *P. Rona* und *H. W. Nicolai*[3] beobachteten starken Säurebildung tatsächlich primär, d. h. unter anaeroben Bedingungen, die *Produktion von Milchsäure* zugrunde liegt. Damit im Einklang steht, daß nach *C. Neuberg* und *G. Gorr*[4] sowie *C. Neuberg* und *E. Simon*[5] sich jene beiden Bakterienarten genau wie die längst als „echte" Milchsäurebildner betrachteten Mikroorganismen, der Lactobacillus und der Bacillus Delbrücki, bei der Dismutation des Methylglyoxalhydrats verhalten, indem sie dieses quantitativ in Milchsäure überführen[5 6].

Auf Grund der verschiedenen anderweitigen Feststellungen kann kaum eine allgemeine Berechtigung den Ansichten zukommen, die *Virtanen* und Mitarbeiter[7] sowohl hinsichtlich der Eignung des Bacterium coli zur Umwandlung des Zuckers in Milchsäure als bezüglich der Dismutation des Methylglyoxalhydrats durch „echte" Milchsäurebildner geäußert haben[7]. Jedenfalls gibt es Stämme, die sich wie „echte" Milchsäurebazillen verhalten.

Meine Versuche mit den beiden genannten Bakteriensorten haben gelehrt, daß das *Natrium- wie Calciumsalz der Gärungs-hexose-mono-phosphorsäure* unter den im experimentellen Teile angegebenen, praktisch anaeroben Bedingungen tatsächlich nicht unwesentliche Mengen Milchsäure liefert. Dabei wird die organisch gebundene Phosphorsäure sehr weitgehend als anorganisches Phosphat in Freiheit gesetzt, und zwar wurden bis 91 % des Ausgangsmaterials zerlegt. Die gefundene Menge Milchsäure steht mit der losgelösten Menge Phosphorsäure nicht im Einklang, sie blieb dahinter zurück. Die Spaltung vollzog sich

---

[1] *C. Neuberg* und *G. Gorr*, diese Zeitschr. **178**, 476, 1926.
[2] *G. Goto*, Scientif. Rep. Inst. f. infect. diseases, Tokio, **4**, 367, 1926.
[3] *P. Rona* und *H. W. Nicolai*, diese Zeitschr. **172**, 82, 1926.
[4] *C. Neuberg* und *G. Gorr*, ebendaselbst **162**, 490, 1925.
[5] *C. Neuberg* und *E. Simon*, ebendaselbst **186**, 331, 1927.
[6] *C. Neuberg* und *G. Gorr*, ebendaselbst **166**, 482, 1925.
[7] *A. J. Virtanen*, *H. Karström* und *R. Bäck*, H. **151**, 241, 1926. Hier wird Methylglyoxal als unangreifbar und Milchsäure als ein Nebenprodukt der Gärung bezeichnet. Neuerdings (H. **155**, 256, 1926) bestätigen die Autoren, daß B. coli Methylglyoxal wie auch Dioxyaceton umwandelt; für letzteres waren schon *W. C. de Graaff* und *A. J. Le Fèvre* (diese Zeitschr. **155**, 313, 1925) früher zu dem gleichen positiven Resultat gelangt.

ziemlich schnell, indem die mitgeteilten Resultate schon nach 3 Tagen zu verzeichnen waren.

Die Einzelheiten ergeben sich aus den experimentellen Daten.

Versuch 1.

Einwirkung von Bacterium lactis aerogenes und Bacterium coli auf das Natriumsalz des Hexose-mono-phosphorsäure-esters.

Nährboden.

5,0 g Pepton-*Witte*, 0,5 g $MgCl_2$, 0,1 g KCl wurden auf 1000 ccm gebracht, auf vier Kolben zu je 250 ccm verteilt und im Dampftopf sterilisiert.

Eine Lösung von 11,0 g des nach *Neuberg* und *Leibowitz* (l. c.) dargestellten reinen Bariumsalzes (entsprechend 10,0 g wasserfreiem Salz) wurde durch genaue Umsetzung mit Natriumsulfat in das entsprechende Natriumsalz übergeführt, auf 250 ccm aufgefüllt und entkeimt.

Hiervon wurden 50 ccm mit Wasser auf 300 ccm aufgefüllt, mit Toluol versetzt und als *Kontrolle* bei 37° belassen.

Die übrigen 200 ccm wurden auf die vier Gefäße mit dem Pepton-Nährboden verteilt. Je zwei Kolben (Inhalt je 50 + 250 = 300 ccm Flüssigkeit) wurden mit Bacterium coli commune bzw. Bacterium lactis aerogenes in großer Aussaat beimpft und dann bei 37° aufbewahrt.

Qualitative Prüfung nach dreitägigem Stehen.

Magnesiumreaktion auf Phosphat.

Bei Bacterium coli . . . . ++
,, ,, lactis . . . . ++
,, Blindprobe mit *Witte*-Pepton. . . . . Spur

Reduktionsvermögen gegen Fehlingsche Lösung.

Bei Bacterium coli . . . . —
,, ,, lactis . . . . —
,, Kontrollflüssigkeit . . . . +++

Quantitative Bestimmungen.

Abgespaltenes anorganisches Phosphat
(kolorimetrisch ermittelt).

Nach 1 Tage waren in Freiheit gesetzt:
bei *Bacterium coli* 0,7902 mg P_2O_5 in 1 ccm Kulturflüssigkeit,
entsprechend 0,1185 g P_2O_5 für 1 g Substanz,
oder 65,9% der abspaltbaren Menge;

bei *Bacterium lactis* 0,7244 mg P_2O_5 in 1 ccm Kulturflüssigkeit,
entsprechend 0,1086 g P_2O_5 für 1 g Substanz,
oder 60,5% der abspaltbaren Menge.

In der *Kontrolle* waren nur 0,0652 mg P_2O_5 in 1 ccm Kulturflüssigkeit, entsprechend 0,0978 g P_2O_5 für 1 g Substanz oder 5,45 % der abspaltbaren Menge nachweisbar.

Nach 3 Tagen waren losgelöst:

bei *Bacterium coli* 0,7762 mg P_2O_5 in 1 ccm Kulturflüssigkeit,
entsprechend 0,1164 g P_2O_5 für 1 g Substanz
oder 64,8 % der abspaltbaren Menge;

bei *Bacterium lactis* 0,8360 mg P_2O_5 in 1 ccm Kulturflüssigkeit,
entsprechend 0,1254 g P_2O_5 für 1 g Substanz;
oder 69,8 % der abspaltbaren Menge.

In der *Kontrolle* waren lediglich 0,0683 mg P_2O_5 in 1 ccm Kulturflüssigkeit, entsprechend 0,0103 g P_2O_5 für 1 g Substanz oder 5,74 % der abspaltbaren Menge zugegen.

Milchsäure.

Nach 1 Tag wurden gefunden:

bei *Bacterium coli* 0,0021 g in 5 ccm Kulturflüssigkeit,
entsprechend 0,0630 g für 1 g Substanz,
oder 21,0 % der nach dem De-phosphorylierungs-grade möglichen Menge;

bei *Bacterium lactis* 0,041 g 5 ccm Kulturflüssigkeit,
entsprechend 0,123 g für 1 g Substanz,
oder 44,7 % der nach dem De-phosphorylierungs-grade möglichen Menge.

Nach 3 Tagen wurden gefunden:

bei *Bacterium coli* 0,0017 g in 5 ccm Kulturflüssigkeit,
entsprechend 0,051 g für 1 g Substanz
oder 17,3 % der nach dem De-phosphorylierungs-grade möglichen Quantität;

bei *Bacterium lactis* 0,0040 g waren in 5 ccm Kulturflüssigkeit,
entsprechend 0,012 g für 1 g Substanz
oder 37,7 % der nach dem De-phosphorylierungs-grade möglichen Menge gebildet.

Versuch 2.

Einwirkung von Bacterium lactis und Bacterium coli auf das Calcium-salz des Hexose-mono-phosphorsäure-esters.

10,0 g Pepton-*Witte*, 1,0 g Magnesiumchlorid, 0,2 g Kaliumchlorid und hexose-mono-phosphorsaures Calcium entsprechend 20,0 g wasserfreiem Salz waren mit Wasser zu 2000 ccm gelöst, auf fünf Kolben verteilt und sterilisiert.



Je zwei Kolben wurden mit Bacterium coli bzw. Bacterium lactis aerogenes besät und bei 37⁰ aufbewahrt.

Ein Kolben wurde unter Toluolzusatz bei 37⁰ *als Kontrolle* belassen.

Qualitative Proben nach dreitägigem Stehen bei 37⁰.

Reaktion auf anorganisches Phosphat.

Bei Bacterium coli	+++
,, ,, lactis	+++
,, Kontrollflüssigkeit	Spur

Reduktionsvermögen gegen Fehlingsche Mischung.

Bei Bacterium coli	schwach
,, ,, lactis	Spur
,, Kontrollflüssigkeit	+++

Quantitative Bestimmungen.

Der Gehalt der bakterienfreien Kontrolle an reinem Hexose-phosphat betrug 1 g in 100 ccm Lösung, entsprechend 0,1045 g Gesamtphosphor in 100 ccm Lösung; sie enthielt also 10,45 % vom Substrat als organisch gebundenen P.

25,0 ccm Kontrollflüssigkeit = 0,25 g Salz lieferten

a) 0,0934 g $Mg_2P_2O_7$,
b) 0,0938 g $Mg_2P_2O_7$.

Nach dreitägigem Stehen bei 37⁰ waren noch vorhanden an *organisch* gebundenem Phosphor im Substrat der Kontrollflüssigkeit: 10,00 %. (Es gaben nämlich 16,5 ccm *Kontrollflüssigkeit* = 0,165 g Salz: 0,0593 g $Mg_2P_2O_7$.)

Bei *Bacterium coli:* 0,82 % des Substrats. (Es gaben nämlich 45 ccm Kulturflüssigkeit = 0,45 g Salz: 0,0132 g $Mg_2P_2O_7$.)

Bei *Bacterium lactis:* 0,83 % des Substrats. (Es gaben nämlich 45 ccm Kulturflüssigkeit = 0,450 g Salz)

a) 0,0136 g $Mg_2P_2O_7$,
b) 0,0130 g $Mg_2P_2O_7$.

Durch die Wirkung der Mikroben waren demnach abgespalten:

Bei Bacterium coli	91,8 %
,, ,, lactis	91,7 %

des organisch gebunden gewesenen Phosphors.

Milchsäure.

Gefunden nach dreitägigem Stehen bei 37°.

Bei Bacterium coli: 40,8 % der nach dem De-phosphorylierungs-grade möglichen Menge. (Es gaben nämlich 10 ccm Kulturflüssigkeit

a) 0,02549 g Milchsäure,
b) 0,02642 g ,, .)

Bei Bacterium lactis wurden 60,3 % der nach dem De-phosphorylierungs-grade möglichen Menge Milchsäure ermittelt. (10 ccm Kulturflüssigkeit lieferten:

a) 0,0330 g Milchsäure,
b) 0,0338 g ,, .)

Nach Abschluß meiner Untersuchungen erschien eine Mitteilung von *R. I. Manning* (Biochem. Journ. **20**, 349, 1927), in der Angaben über die bakterielle Zersetzung von Hexose-mono- und -di-phosphat durch das Coli-bakterium enthalten sind. Der Autor hat seine Versuche auf 7 bis 10 Tage ausgedehnt und zugleich, allem Anscheine nach, ohne jede Zugabe stickstoffhaltiger Nährstoffe gearbeitet. Unter diesen Verhältnissen erhielt er geringere Milchsäure-Ausbeuten, vermutlich infolge sekundärer (auch in meinen Experimenten angedeuteten) Zersetzung von Lactat während der langen Dauer seiner Versuche. Ferner ist in Betracht zu ziehen, daß nach den Befunden von *Fr. Verzár* und *I. Bögel* (diese Zeitschr. **91**, 1, 1918; **108**, 207, 1920 sowie von *K. Scheer* (diese Zeitschr. **130**, 535, 1922) der Stoffwechsel des Bact. coli durch Zusätze in andere Bahnen gelenkt werden kann.

Über die Wirkung einiger nach dem Verfahren von Gulewitsch und Krimberg gewonnener Fraktionen des Liebigschen Fleischextraktes auf die Magensekretion.

Von

A. Korchow (Omsk-Sibirien).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 9. August 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die Wirkung des *Liebig*schen Fleischextraktes auf die Magensekretion wurde seinerzeit von der Schule von *I. P. Pawlow* bei der peroralen und intravenösen Einführung des Extraktes festgestellt und ist durch die Arbeiten aus dem Laboratorium von *A. Bickel* bei subkutaner Einführung (Molnar) bestätigt worden. Diese Beobachtungen ließen folgende Fragen auftauchen: 1. Welche bekannten Bestandteile des Extraktes beeinflussen den Sekretionsapparat des Magens? 2. Wie ist der Wirkungsmechanismus dieser Substanzen beschaffen?

Die erste Frage konnte von mir teilweise bereits im Jahre 1912 beantwortet werden. Ein umfangreicheres Material betreffend diese Frage ist in meiner Dissertationsarbeit enthalten, die infolge der außerordentlichen Zeitverhältnisse erst 1922 veröffentlicht worden ist. Meine Arbeit wurde im Laboratorium der Universität zu Charkow unter der Leitung von Prof. *R. P. Krimberg* durchgeführt und leitete eine ganze Anzahl von Arbeiten, die aus demselben Laboratorium erschienen sind, ein.

Es sind auch Arbeiten anderer Autoren, die auf demselben Gebiet tätig waren, veröffentlicht worden. Zu den früheren Arbeiten, welche die Tatsache feststellen, daß keine den Fleischextrakt zusammensetzenden Teile (Kreatin, Carnin, Sarkin, Xanthin, Leucin) die Magensaftabsonderung anregten (*I. Pawlow*), sondern daß nur ein Gemisch von Aminosäuren — daß Aminosäuren nach der peroralen Gabe sekretionssteigernd wirken, wurde inzwischen von *Bickel* nachgewiesen — eine solche Sekretion hervorrufen kann, muß man noch die neueren Arbeiten von den amerikanischen Verfassern (*A. C. Ivy* and *A. I. Javois*) erwähnen. Aus diesen Arbeiten kann man sehen, daß Fleisch und Milch nach Hydrolysierung ein Gemisch

von Aminosäuren geben, welche nur nach Einführung per os, aber nicht subkutan eine starke Magensaftsekretion hervorrufen. Von einzelnen Aminosäuren, welche solche Wirkung bei peroraler Einführung haben, wurde Alanin, Glykokoll und Cysteinchloridhydrat untersucht. Von verschiedenen Aminen wurde nur das Histamin subkutan geprüft, das eine starke Magensaftabsonderung hervorruft.

Die Untersuchungen von *Ivy* mit dem isolierten Blindsack, welcher in eine Mamma transplantiert worden war, zeigten, daß nach subkutanen Histamin- oder Gastrininjektionen eine Magensaftabsonderung auftrat. So wurde noch einmal der humorale Weg für die Magendrüsenerregung bewiesen. Nach unseren Versuchen aus dem Jahre 1915, von denen auch *R. Krimberg* spricht, gibt es spezifische Stoffe im Fleischextrakt, dipeptische, wie z. B. Carnosin und Oxybetaine, wie z. B. Carnitin, die durchaus Sekretincharakter haben.

Ich nenne noch die Arbeit von *S. Schwarz*, Wien, über die Wirkung von Carnosin auf die Magensaftsekretion. Diese 1924 erschienene Arbeit scheint die von uns festgestellte Tatsache der Wirkung von Carnosin als einem im Organismus selbst enthaltenen spezifischen Magensaftsekretin zu widerlegen. Unter anderem wird in dieser Abhandlung ausdrücklich behauptet, daß „wir im Carnosin keinesfalls den die Magensaftsekretion auslösenden Körper unter den Muskelextraktivstoffen zu suchen haben". *R. Krimberg* hat in seiner Erwiderung auf diese Behauptung ihr die Zahlenwerte entgegengehalten, die sich aus einem der von mir angestellten Versuche ergeben haben, bei welchem Carnosin in der Dosis von 0,18 g intravenös eingeführt wurde und reichliche Absonderung von Magensaft auslöste.

Ähnlich wirkt auch eine andere Stickstoffbase, die von mir aus dem Fleischextrakt gewonnen und einem Hunde mit kleinem Magen nach dem Verfahren von *Pawlow* unter die Haut und in das Blut eingeführt wurde. Die nach der Bearbeitung des nach dem Verfahren von *Gulewitsch* und *Krimberg* gewonnenen und bis zur Sirupkonsistenz eingedickten Fleischextraktes mit heißem Alkohol gewonnene Carnitinfraktion ruft an und für sich nach ihrer subkutanen und peroralen Einführung in bestimmten Dosen Magensaftabsonderung hervor.

Aus meinen Versuchen geht ebenfalls das nicht indifferente Verhalten der Speicheldrüsen, der Gallenabsonderungsfunktion der Leber und des motorischen Apparates der Därme gegenüber dem in das Blut eingeführten Carnosin, Methylguanidin und der wässerigen Lösung des Alkoholextraktes der Carnitinfraktion hervor. Bei Methylguanidin konnte darüber hinaus neben hochgradiger nervöser Erregung ausgesprochene exspiratorische Atemnot beobachtet werden. Diese Nebenwirkungen erwähne ich bloß flüchtig, da sie spezielle Untersuchungen anregen sollten, die in der Tat in den letzten Jahren angestellt worden sind. (*R. Krimberg*, *S. Komarow*.)

Die nachstehende Tabelle veranschaulicht das mehr oder weniger summarische Resultat der seinerzeit durchgeführten Arbeiten.



Es erscheint angebracht, diese Resultate hier anzuführen, da die vorliegende Arbeit die natürliche Fortsetzung der früheren Arbeiten ist. Insgesamt wurden 57 Versuche angestellt. Die Versuche wurden an Hunden mit isoliertem *Pawlow*schen Magen und mit einfacher Magenfistel durchgeführt. In der nachstehenden Tabelle sind die Ergebnisse der Wirkung maximaler, mittelgroßer und minimaler Dosen auf die Magensekretion lediglich bei Hunden mit *Pawlow*schen Magen angegeben.

Tabelle I.

Menge der intravenös eingeführten Substanzen g	Gesamtmenge des Magensaftes ccm	Dauer der Sekretion Minuten	Latenzperiode Minuten
Carnitin			
0,6	2,4	87,0	18,0
0,4	1,0	88,0	—
0,3	0,9	47,5	—
Carnosin			
1,0	5,4	214,0	31,0
0,19	3,5	116,0	3,0
0,09	2,4	49,0	4,5
0,02	1,0	45,0	5,0
Methylguanidin			
0,32	0,5	52,0	8,0
0,12	0,3	53,0	17,0
0,06	0,7	45,0	15,0
Carnitinfraktion			
5,0 ccm	0,8	46,0	1,0

Die Tabelle II enthält sowohl die Ergebnisse der Wirkung der in den großen Magen durch die Sonde eingeführten Substanzen, als auch die Ergebnisse der Kontrollversuche mit Wasser und Fleischextrakt.

Tabelle II.

	Gesamtmenge des Magensaftes ccm	Sekretionsdauer Minuten	Latenzperiode Minuten
Carnitinfraktion			
5 ccm + 95 ccm Wasser	1,5	105	14
2,5 „ + 97,5 „ „	1,5	105	13
1,2 „ + 98,8 „ „	0,2	63	8
10 dg Fleischextrakt			
+ 100 ccm Wasser	2,1	95	12
+ 200 „ „	0,7	45	7
+ 100 „ „	0,2	30	—
100 dg Pferdefl. + 100 ccm Wasser .	2,7	122	7

Aus diesen beiden Tabellen erhellt, daß Carnosin die größte Wirkung auf die Drüsen der Magenschleimhaut ausübt. Selbst mittelgroße Dosen bewirken durch Reizung der Drüsen auf hämatogenem

Wege reichlichere Saftabsonderungen (3,5 ccm) und längere Sekretionsdauer als der kompliziertere und, wie man annehmen dürfte, aktivere Prozeß, der durch die Verspeisung von 100,0 g gemahlenem Rindfleisch, vermengt mit 100 ccm Wasser ausgelöst wird. Nach dem Gehalt an HCl ist Carnosinsaft sogar etwas saurer.

Die im ersten Versuch zufällig angewandte Dosis von 1,0 g Carnosin erwies sich als sehr toxisch und rief stürmische Peristaltik, häufige flüssige Stuhlgänge, Harnung und Erbrechen hervor.

Die aktive Minimaldosis beträgt nicht unter 0,02 g bei einem Hunde von 14 kg, da der zweimalige Versuch mit 0,01 keine Magensaftabsonderung hervorgerufen hat.

Den zweiten Platz in bezug auf Aktivität nimmt das Carnitin ein. Die dritte Stelle beansprucht die in bestimmten Dosen in den großen Magen eingeführte wässerige Lösung des Alkoholextraktes der Carnitinfraktion.

Wenn auch Alkoholextrakte aus reinem Fleischextrakt (*Lobassow*) keine Aktivität zeigten, so geht doch, bei einer bestimmten Behandlung des Fleischextraktes, in die Alkoholextrakte sicher eine Substanz über, die sich als hochwirksames Magensekretin erweist.

Fast inaktiv in bezug auf die Magendrüsen hat sich das Methylguanidin erwiesen. Es muß jedoch hervorgehoben werden, daß auch bei dem Methylguanidin jedesmal eine geringe Sekretion aus dem kleinen Magen mit bestimmten Reizungserscheinungen an den Drüsen beobachtet werden konnte.

In einer Anzahl von Versuchen, die an Hunden mit einfacher Fistel angestellt wurden, fiel die große Menge der in den Magen getriebenen Galle auf, was bei der Einführung von Carnitin und alkoholischer Carnitinfraktion in das Blut desselben Hundes niemals beobachtet wurde. Daneben wurde energisches „Kauen“ und reichliche Speichelabsonderung beobachtet. Es schien, als ob sämtliche Drüsen des Verdauungskanals in einen Reizzustand gebracht worden wären. Diese Wirkung auf die Gallenabsonderung ist von mir in meiner Zusammenfassung der Versuchsergebnisse unterstrichen worden.

Im Laboratorium von Prof. *A. Bickel* versuchten wir der Lösung der zweiten, eingangs erwähnten Frage über die Beschaffenheit des Wirkungsmechanismus der im *Liebig*schen Fleischextrakt, im frischen Rindfleisch und in den Muskeln des Menschen enthaltenen Stickstoffbasen auf den Magensekretionsapparat näherzutreten. Nebenbei wollten wir die Wirkung einiger bei der Bearbeitung des Fleischextraktes gewonnener Fraktionen auf die Magensekretion nachprüfen und die Wirkung der subkutanen und peroralen Einführung einiger der vorstehend erwähnten Substanzen untersuchen.

Die Versuche wurden von uns parallel an einem Hunde mit *Pawlow*schen und an einem mit *Bickel*schen kleinem Magen angestellt. Bei dem *Bickel*schen Verfahren hängt der kleine Magen nur mittels des Gefäßsystems mit dem großen Magen zusammen. Der Hund für den *Bickel*schen Versuch wurde von uns am 18. Mai operiert, die Versuche wurden am 21. Juni eingeleitet. Der Hund war zunächst untersucht worden, wobei wir uns von seiner vollständigen Erholung nach der Operation überzeugen konnten. Während der Zwischenzeit zwischen der Operation und dem Beginn der Versuche (34 Tage) sind die distalen Fasern der durchschnittenen Äste der nn. Vagi usw. bereits der Degeneration anheimgefallen, was praktisch durch die Sistierung der „kontinuierlichen Sekretion" (*Bickel*) nachgewiesen werden konnte.

Zu solchem Zeitpunkt können die Drüsen des Magens nur durch in das Blut eingeführte chemische Substanzen erregt werden. Zu diesen gehören auch die Sekretine, die bei der Verdauung aus dem Pylorusteil des Magens in das Blut gelangen, und vielleicht auch die Sekretine, die von den Muskeln gebildet werden und auf dem Blutwege die Drüsen unmittelbar reizen (*Bickel*, *Krimberg*). Vielleicht werden sich sogar die Pylorussekretine selbst, wenn es gelingt, in ihr chemisches Wesen näher einzudringen, als verwandt oder sogar identisch mit den Stickstoffbasen, die von den Muskeln gebildet werden, erweisen.

Für unsere Zwecke nahmen wir 450 g Fleischextrakt und unterwarfen es der sukzessiven Behandlung nach dem Verfahren von *Gulewitsch* und *Krimberg*.

Für die physiologischen Versuche brauchten wir: 1. reinen Fleischextrakt, 2. die erste Carnosinfraktion (bis zur Entfernung der Alloxurbasen), 3. die zweite Carnosinfraktion, die aus der zur Kristallisation des reinen salpetersauren Carnosins bereitgehaltenen Gesamtmasse entnommen wurde. Bloß die für die Versuche entnommene Portion wurde mit 20% HCl neutralisiert, und das Carnosin wurde den Hunden in der Form einer neutralen Lösung von salzsaurem Carnosin eingeführt.

Die Menge der eingeführten Substanz wurde proportional dem aktiven, die Sekretion auslösenden Quantum von Fleischextrakt berechnet. Für die Carnosin- und Carnitinfraktion wurde außerdem ihr Gehalt an reinen Substanzen auf Grund theoretischer Berechnungen nach ihren Mittelwerten bei ihrer Gewinnung aus Fleischextrakt ermittelt.

So z. B. betrug bei uns die aktive Dosis vom Fleischextrakt 2,5 g.

Nach *Krimberg* enthalten 1000 g Fleischextrakt durchschnittlich 28 g reines Carnosin, d. h. 2,5 g Fleischextrakt enthalten 0,07 g Carnosin.

Aus unserer früheren Arbeit aber geht hervor, daß 0,07 g die aktive Carnosindosis darstellt.

Von den 900 ccm der Carnosinfraktionslösung nahmen wir einen zehnten Teil für unsere Versuche. Das restliche Quantum unterzogen wir der weiteren Behandlung. Die für die physiologischen Versuche entnommene Portion wurde mit 20% HCl neutralisiert, auf das halbe

Volumen eingedickt und bei den Versuchen nach Maßgabe der Berechnung verwandt. 3 ccm entsprechen 2,5 g Fleischextrakt oder 0,07 g reinen Carnosins.

Von 26,2 g des trockenen alkoholischen Carnosinextrakts wurde ein Fünftel, d. h. 5,2 g, entsprechend 90 g Fleischextrakt, entnommen und in 25 ccm Wasser aufgelöst. 25 ccm unserer Lösung entsprachen somit 90 g, oder 1 ccm der Lösung entsprach 3,5 g Fleischextrakt.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß wir bei unserer früheren Arbeit aus 460 g Fleischextrakt 22 g einer Sublimatverbindung von Carnitin gewinnen konnten, ergibt sich aus der Formel $\frac{22 \cdot 3{,}5}{460} = 0{,}1$, daß 1 ccm unserer Lösung 0,1 ccm Sublimatcarnitin enthält. Aus den einschlägigen Formeln ergibt sich aber, daß 0,1 g des Sublimatsalzes von Carnitin 0,028 g der Chlorverbindung von Carnitin entspricht, welch letztere wir bei unseren früheren Arbeiten in das Blut der Versuchshunde einführten. Somit enthalten 2,5 g Fleischextrakt etwa 0,02 g des salzsauren Salzes von Carnitin. Diese Dosis hatte sich bereits bei unseren früheren Versuchen mit intravenöser Einspritzung von reinem Carnitin als unaktiv erwiesen. Deshalb verwandten wir bei dem 13 kg wiegenden Hunde 5 ccm und bei dem 23 kg wiegenden Tiere 9 ccm.

Die dritte Serie der Versuche endlich wurde mit der zweiten reinen Carnosinfraktion angestellt. Nach der Bearbeitung mit salpetersaurem Silber und Baryt, nach der Entfernung des Silbers durch Sättigung mit Schwefelwasserstoff und der Barytreste durch Sättigung mit Kohlensäure wurde die so gewonnene, ausgesprochen alkalisch reagierende Flüssigkeit, unter Berücksichtigung des früher entnommenen Zehntels, genau gemessen, ein weiteres Zehntel entnommen und dieses mit 20% HCl neutralisiert. Der restliche Teil wurde mit 20% NO_3H neutralisiert, aufs äußerste eingedickt und nach Hinzufügung von absolutem Alkohol auf Eis zur Kristallisation des salpetersauren Carnosins gestellt.

Die für die physiologischen Versuche entnommenen 20 ccm entsprachen 45 g Fleischextrakt oder 2,8 g reinem Carnosin. 1 ccm enthielt 0,14 g reines Carnosin und entsprach 2,1 g Fleischextrakt. Diese Dosis wurde bereits bei den Versuchen mit der intravenösen Carnosineinverleibung als aktiv erkannt. Für die subkutane Einführung verwandten wir bei dem kleineren *Pawlow*schen Hunde 1,5 ccm und bei dem größeren *Bickel*schen Hunde 2,3 ccm. Die Ergebnisse der Versuche lassen sich aus den nachstehenden Diagrammen ersehen.

Aus der ersten Tabelle kann man schließen, daß der *Pawlow*sche Magen am stärksten auf die subkutan eingeführte Lösung der ersten Carnosinfraktion reagiert.

Die Wirkung dieser Lösung ist stärker als bei der subkutanen Einführung von Histamin (0,0005) und Fleischextrakt (2,5 g). Es muß hervorgehoben sein, daß jegliche lokale und allgemeine Reaktion bei den subkutanen Einverleibungen der Carnosinfraktionen ausblieb.

Fast die gleiche Wirkung auf die Magensekretion übte bei demselben Hunde die Carnitinfraktion aus, bei der aber beim Hunde Unruhe, Winseln, Stuhldrang (Aufsitzen und Haltung wie bei Stuhlentleerung) beobachtet wurden. Eine geringere Wirkung als die Carnitin-

fraktion entfaltete die zweite Carnosinfraktion, aber auch diese bewirkte einen doppelt so hohen Kurvenanstieg als Histamin und Fleischextrakt.

Die Injektion von 100 ccm Wasser durch die Sonde bewirkte eine unverkennbare, aber geringe Magensaftabsonderung mit ausgesprochener Kongoreaktion. Dabei trat bei dem Versuch mit der zweiten Carnitin-

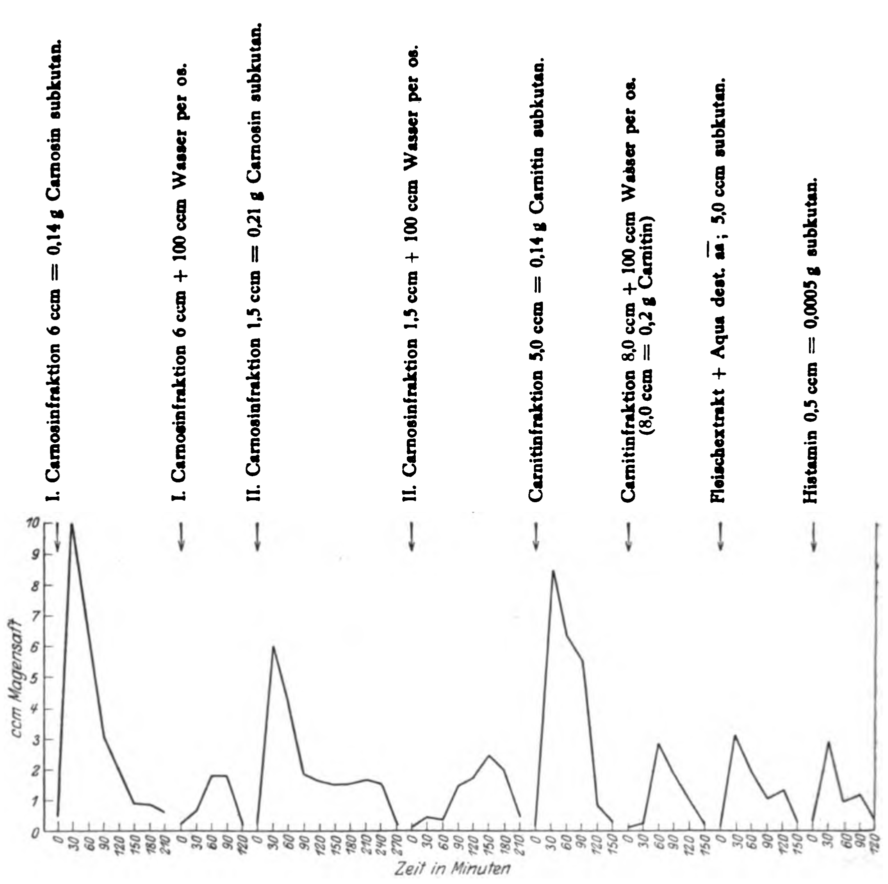


Abb. 1. *Pawlow*scher Magenblindsackhund. 13 kg.

fraktion die Sekretion aktiven HCl-haltigen Saftes erst nach 1 Stunde auf und erreichte ihren Höhepunkt in der fünften halben Stunde, d. h. zu einer Zeit, wenn unter gewöhnlichen Verhältnissen die Sekretion zu Ende geht. Anscheinend bedurfte es einer bestimmten Zeit, bis die Lösung in das Duodenum überging, dann erfolgte die Resorption der Lösung, und erst danach setzte die Funktion der Drüsen ein. Die perorale Einführung der Carnitinfraktion war ebenfalls von den er-

wähnten Nebenwirkungen begleitet. Die Menge des Magensaftes war etwas größer als bei der peroralen Einführung der Carnosinfraktion.

Bei dem Hunde mit dem *Bickel*schen kleinen Magen wurde die stärkste Wirkung im Vergleich mit den anderen Reizen, aber eine gleich starke im Vergleich mit Histamin (0,001) durch bestimmte Dosen der ersten und zweiten Carnosinfraktion erreicht.

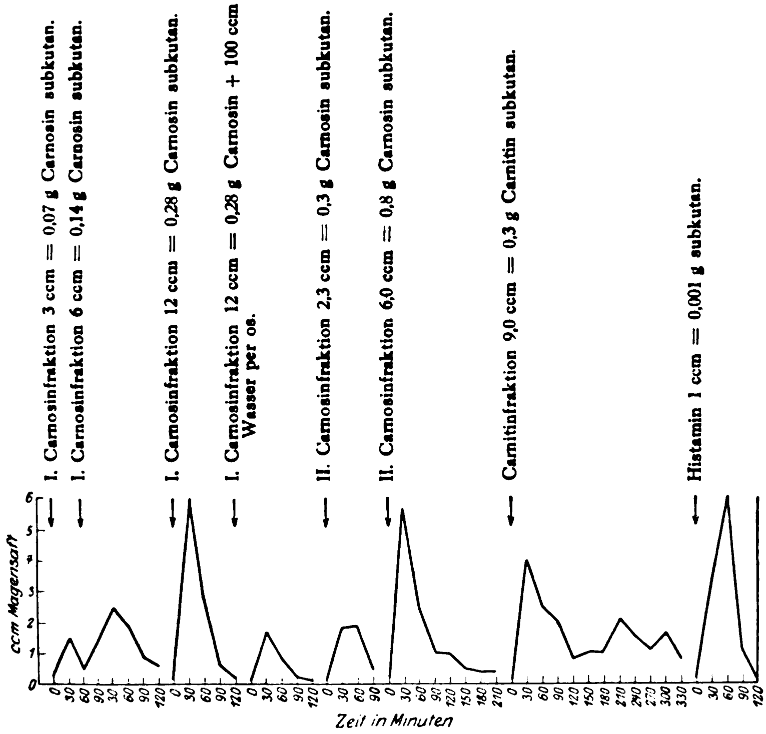


Abb. 2. *Bickel*scher Magenblindsackhund. 23 kg.

An zweiter Stelle steht die Carnitinfraktion, die ebenso wie beim ersten Hunde Unruhe, Stuhldrang und zweimalige Defäkation verursacht hat.

Die perorale Einführung der ersten Carnosinfraktion rief ebenfalls unverkennbare Magenabsonderungen, aber nur in geringem Maße hervor.

Will man sich den Wirkungsmechanismus der besprochenen Substanzen erklären, so darf angenommen werden, daß sie die Drüsen des kleinen Magens auf humoralem Wege beeinflussen, indem sie auf die Drüsenzellen wirken. Ob sie unmittelbar wirken oder aber erst die Bildung spezifischer Sekretine im Pylorusteil des Magens begünstigen,

die dann auf die Drüsenzellen wirken, läßt sich aus unseren Versuchen nicht entscheiden. Die Frage, wovon eigentlich der Unterschied in der Sekretionstätigkeit des *Pawlow*schen und *Bickel*schen Magens unter dem Einfluß verschiedener Reize abhängt, kann vorläufig nur unter Vorbehalt beantwortet werden.

Bei unseren Versuchen mit subkutaner Einführung der Carnosin- und Carnitinfraktionen ließ sich eine reichlichere Sekretion bei dem Hunde mit *Pawlow*schen kleinem Magen nicht nur halbstündlich, sondern auch summarisch nachweisen. Ersteres erhellt aus den Tabellen I und II, das zweite aus der Gegenüberstellung folgender Daten (Tabelle III).

Tabelle III.

	Menge subkutan ccm	Entsprechende Menge der Substanz g	Menge des Magensaftes ccm	Sekretionsdauer Minuten
1. Hund mit dem *Pawlow*schen kleinen Magen, 13 kg.				
1. Carnosinfraktion . .	6	0,14	24,7	2,5
2. „ . .	1,5	—	14,9	2,5
Carnitinfraktion . . .	5	0,14	21,6	2,5
Fleischextrakt	2,5	0,07 — 0,02	8,6	2,5
2. Hund mit dem *Bickel*schen kleinen Magen, 23 kg.				
1. Carnosinfraktion . .	12	0,28	9,6	2,5
2. „ . .	6	0,80	10,9	2,5
Carnitinfraktion . . .	9	0,25	10,2	2,5
Fleischextr. per os 10%	100	0,28 + 0,08	8,4	2,5

Es ist aus unseren Kurven ersichtlich, daß die Menge des Magensaftes bei demselben Hunde proportional ist der eingeführten Menge der Reizsubstanz. Bei dem Hunde mit dem *Bickel*schen Magen ergab bei dem ersten, zweiten und vierten Versuch (auf der Kurve von links nach rechts, Abb. 2) die Verdoppelung der eingeführten Substanz von 3 auf 6 ccm und dann auf 12 ccm ungefähr auch einen doppelt großen Kurvenanstieg, von 1,4 auf 2,5 auf 6. Die Erhöhung der Dosis der zweiten Carnosinfraktion von 2,3 auf 6 ccm ergab einen Anstieg der Kurve von 1,8 auf 5,6.

Aber bei verschiedenen Hunden, ungeachtet der doppelt großen Menge der eingeführten Carnitin- und ersten Carnosinfraktion und sogar vierfachen Menge der zweiten Carnosinfraktion, d. h. ungeachtet der Erhöhung der eingeführten Menge über das dem Gewichtsunterschied der Tiere entsprechende Maß hinaus, wurde am *Bickel*schen Magen eine weniger intensive Sekretion sowohl hinsichtlich des Anstieges der Kurve wie auch hinsichtlich des Gesamtquantums des Magensaftes beobachtet.

Diese Verhältnisse beobachten wir bei der Anwendung der Carnosin- und Carnitinfraktionen, während die Versuche mit Histamin an denselben Hunden gezeigt haben, daß die Erhöhung des subkutan eingeführten Histamins von 0,5 auf 1 ccm, im Vergleich mit dem *Pawlow*schen Magen, eine Zunahme des Kurvenanstieges von 3 auf 6,1 und der Gesamtmenge der Absonderung von 5,6 auf 10,4 ccm bewirkt hat.

Wenn man von der Annahme ausgeht, daß der *Bickel*sche Magen einen geringeren Flächeninhalt aufweist als der *Pawlow*sche, und darauf den beträchtlichen Unterschied in der Sekretionstätigkeit unter der Einwirkung unserer spezifischen Reize zurückzuführen versucht, so stößt man sofort auf die dieser Mutmaßung widersprechenden Befunde bei der Histaminsekretion.

Es darf jedoch angenommen werden, daß die vollständige Isolierung des *Bickel*schen Magens von dem extramuralen Nervensystem die Tätigkeit des Magens bis zu einem gewissen Grade beeinflußt. Darüber hinaus wirkt Carnosin unzweifelhaft auf das Nervensystem der Gefäße und auf die anderen Sekretionsapparate des Darmrohres, deren Beziehung zum isolierten *Bickel*schen Magen noch der Aufklärung harrt.

Die toxischen Eigenschaften der Carnitinfraktion hängen sicher nicht von dem in ihr enthaltenen Carnitin ab, das, selbst wenn es in großen Dosen subkutan in reinem Zustande eingeführt wird, gar keine toxische Wirkung aufweist, wie unsere früheren Versuche gezeigt haben. Eher dürften für diese Giftwirkung das Methylguanidin, das in der Fraktion enthalten ist, und vielleicht auch noch andere uns unbekannte Substanzen verantwortlich gemacht werden.

Auf Grund der vorstehenden Ausführungen können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

1. Die Carnosinfraktion des Fleischextraktes sowohl als auch das darin enthaltene Carnosin stellen, wenn sie unter die Haut oder unmittelbar in das Blut eingeführt werden, starke Reizstoffe für die Magendrüsen dar.

2. Die Carnitinfraktion des Fleischextraktes wirkt auf die Drüsen durch das Blut nach Maßgabe ihres Gehaltes an Carnitin.

3. Beide Fraktionen rufen, wenn sie in bestimmten Mengen durch die Sonde eingeführt werden, eine im Vergleich mit der subkutanen Einführung geringe Magensaftabsonderung hervor, wobei das Maximum des Kurvenanstieges auf die dritte und fünfte halbe Stunde, nicht aber auf die erste halbe Stunde, wie es bei der intravenösen und subkutanen Einführung beobachtet wird, entfällt.

4. Die Wirkung auf die Drüsen erfolgt auf humoralem Wege durch das Kreislaufsystem. Die Ausschaltung der Wirkung des extramuralen



exzitosekretorischen und depressosekretorischen Nervensystems (Vagus und Sympathicus) am *Bickel*schen Magen setzt die Reizbarkeit der Drüsen herab.

Literatur.

1) *R. Krimberg*, Zur Frage nach dem Sekretionsmechanismus der Magendrüsen. Charkow 1915. — 2) *A. P. Korchow*, Materialien zur Frage über die Magensekretion aus dem Muskelgewebe (Dissertation). — 3) *C. Schwarz*, Pflügers Arch. **202**, 435, 1924. — 4) *A. Bickel*, Intern. Beitr. z. Pathol. u. Therap. d. Ernährungsstörung. **5**, H. 1. — 5) *Derselbe*, Ergebn. d. Physiol. **24**, 1925. — 6) *R. Krimberg*, diese Zeitschr. **157**, 187, 1925. — 7) *A. C. Ivy*, Journ. of the Amer. med. assoc. **85**, Nr. 12, 1925. — 8) *A. C. Ivy* und *A. J. Javois*, The Amer. Journ. of Physiol. **73**, Nr. 3, 583 bis 590, 1925. — 9) *R. Krimberg* und *S. A. Komarow*, diese Zeitschr. **176**, 73, 1926. — 10) *Dieselben*, ebendaselbst **184**, 442, 1927.

Über die Genauigkeit der gasometrischen Stickstoffbestimmung in kleinen Blut- und Harnmengen mit Hilfe von Bromlauge und des Apparates von Borodin.

Von

L. Solowjew.

(Aus der biochemischen Abteilung des Instituts für experimentelle Medizin zu Leningrad.)

(Eingegangen am 20. August 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die Reaktion des Harnstoffs und des Ammoniaks mit Hypochloriten und Hypobromiten (praktisch mit der chlorierten oder bromierten Lauge), die sich nach der Gleichung

$$1.\ 2\,NH_3 + 3\,NaBrO = 3\,NaBr + 3\,H_2O + N_2,$$

$$2.\ CO(NH_2)_2 + 3\,NaBrO = 3\,NaBr + 2\,H_2O + CO_2 + N_2$$

vollzieht, wird schon seit langem für die quantitative Bestimmung dieser Verbindungen aus dem Volumen des frei werdenden Stickstoffs benutzt.

So schlug *Melsens*[1] (1852) vor, die chlorierte Lauge für die Bestimmung der Ammoniaksalze im Dünger und Guano zu benutzen. Mehrere Autoren arbeiteten nach ihm mit derselben Lauge. *Knop*[2] (1870) arbeitete eine Methode für die Bestimmung des Ammoniaks und des Harnstoffs mittels Bromlauge aus, die später von *Huefner*[3] (1870) modifiziert wurde. Eine Reihe von Forschern stellte fest, daß die Reaktionen nicht quantitativ der geschilderten Gleichung folgen und daß die Menge des freigesetzten Stickstoffs für Ammoniak 98 bis 95% der theoretischen beträgt, für Harnstoff 98 bis 90%. *P. Wagner*[4] verbesserte den Apparat für die

---

Nach der Arbeit von *B. Margosches* und *H. Rose*, „Zur Deutung des Methodenfehlers der Harnstoff-Hypobromitmethode", diese Zeitschr. **187**, 542, 1923:

[1] *Melsens*, Jahrb. d. Chem. 1852, S. 725.

[2] *Knop*, Zeitschr. f. analyt. Chem. 1870, S. 225.

[3] *Huefner*, Jahresber. d. Chem. 1871, S. 867; Zeitschr. f. analyt. Chem. 1871, S. 486.

[4] *P. Wagner*, Zeitschr. f. ana'yt. Chem. 1874, S. 383.

Stickstoffbestimmung, modifizierte die Methode der Bereitung der Bromlauge und kontrollierte die früher von *Dietrich*[1] angegebenen Tabellen der Korrekturen.

Später, als man sich bemühte, die Methode zu verbessern und den Korrektionsfaktor zu verkleinern, wurde eine große Anzahl (mehr als 50) von Bromlaugen verschiedener Zusammensetzung und eine nicht geringere Anzahl von Apparaten für diesen Zweck vorgeschlagen[2].

Ebenso empfahl man, zur NaCl-Lösung verschiedene Stoffe wie Zucker, K-cyanat, Äther acetoaceticus und andere zuzusetzen, die keine Verbreitung fanden.

Von den vorgeschlagenen Apparaten sind der von *Knop-Huefner* und — in Rußland — der von *Borodin* am meisten bekannt.

Dieselbe Methode wurde von mehreren Forschern (*Hamburger*, *Artmann*, *Skrabal* und mehreren anderen) für die jodometrische Bestimmung derselben Verbindungen benutzt. *B. Pohorecka-Lelesz*[3] arbeitete eine derartige Mikromethode aus.

Margosches und *Rose*[4] arbeiteten eine alkalimetrische Bestimmungsmethode aus, die darin besteht, daß man zu einer bestimmten Menge der Bromlauge eine bestimmte Menge HCl — im Überschuß — zusetzt. Nach dem Erhitzen und der Bromentfernung wird der Überschuß an HCl mit NaOH zurücktitriert. Dasselbe wird *nach* der Reaktion ausgeführt. Die Differenz zweier Titrationen zeigt die Mengen der gesuchten Substanz und des Hypobromits an, die reagiert haben.

Obgleich viele Untersuchungen vorliegen, die sich mit der Frage des unvollständigen Freiwerdens des Stickstoffs beschäftigen, gibt es bis jetzt keine eindeutige Lösung dieser Frage.

So glaubt *Lunge*[5], daß die Ursache der unvollständigen Freisetzung des Stickstoffs in dem Auftreten eines chemischen Gleichgewichts in der Reaktionsmitte liegt, dank welchem ein Teil der untersuchten Substanz nicht in die Reaktion eintritt; dieses Gleichgewicht hängt von der Konzentration der reagierenden Stoffe, den Eigenschaften des Hypobromits, der Temperatur usw. ab.

Treadwell[6] sieht diese Ursache in der Bildung des Ammoniumhypobromits. *M. Krogh*[7] beobachtet bei der Reaktion die Bildung von Stickoxyden. *M. Lescoeur*[8] hält die Bildung des Na-Cyanats für die Ursache der unvollständigen Stickstoffausscheidung, während *Chattaway*[9] die Bildung des Tribromstickstoffs dafür verantwortlich macht. *Margosches* und *Rose*[10]

---

[1] *Dietrich*, Zeitschr. f. analyt. Chem. 1866, S. 36.

[2] Eine ausführliche Darlegung dieser Frage mit dem Literaturverzeichnis kann in der zitierten Arbeit von *Margosches* und *Rose* gefunden werden (s. S. 199) und auch in der Arbeit von *W. Dehn*, Zeitschr. f. analyt. Chem. 1906, S. 604.

[3] *B. Pohorecka-Lelesz*, Bull. d. Soc. d. Chim. Biol. **6**, 773, 1924.

[4] *B. Margosches* und *H. Rose*, diese Zeitschr. **136**, 119, 1923.

[5] *Lunge*, Chem. Industrie 1885, S. 161 (nach *Margosches* und *Rose*).

[6] *Treadwell*, Lehrb. d. analyt. Chem., Bd. 2.

[7] *M. Krogh*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 84, 379, 1913.

[8] *M. Lescoeur*, Journ. de Chim. et Pharm. **20**, 305, 1919 (nach *Pohorecka-Lelesz*).

[9] *P. Chattaway*, Chem. News 98, 285, 1908.

[10] l. c., S. 1.



kommen zu dem Schluß, daß die Ursache der Unvollkommenheit der Reaktion weder in der Löslichkeit des Stickstoffs in der alkalischen Hypobromitlösung, noch in der Bildung der Stickstoffoxyde oder Cyanate liegt, sondern im Auftreten eines Gleichgewichts, nach der Meinung von *Lunge* und *Treadwell.*

Obgleich die Methode der Stickstoffbestimmung mittels Bromlauge in strengem Sinne keine quantitative ist, so behält sie ihre Bedeutung doch auch heute, meistenteils als eine klinische Methode, weil sie schnell zu arbeiten erlaubt, ohne komplizierte Apparatur oder Reagenzien und mit genügender Genauigkeit für klinische Zwecke. Als Beweis dafür kann der Umstand dienen, daß immer noch Verbesserungen daran vorgenommen werden.

Einige Forscher haben schon lange geraten, die Stickstoffbestimmung nach *Kjeldahl* derart zu modifizieren, daß nach der Verbrennung und Neutralisation die Flüssigkeit der Zersetzung mit Bromlauge in einem dazu brauchbaren Apparat unterworfen wird. Voriges Jahr publizierte *R. Voit*[1] eine Methode, nach welcher die Verbrennung kleiner Mengen von Blut oder Harn mit 30% Wasserstoffsuperoxyd ausgeführt wird, darauf wird die Flüssigkeit der Wirkung der Bromlauge in dem von ihm für diesen Zweck vorgeschlagenen Apparat unterworfen. Nach den Angaben des Verfassers gibt diese Methode gute Resultate, erlaubt schnell zu arbeiten und der Fehler übertrifft im Mittel nicht $\pm$ 2,0%.

Der Zweck dieser Arbeit ist, die Fehlergrenzen der Bestimmung aufzuklären, ebenso wie die günstigsten Bedingungen für die Reaktion. Wir brauchten für die Verbrennung 30% Wasserstoffsuperoxyd und für die Zerlegung den Apparat von *Borodin*, weil er der verbreitetste in der russischen Klinik ist und andere Apparate — z. B. der von *Voit* — sich von ihm im wesentlichen wenig unterscheiden.

Ich brauche für die Bestimmung folgende Reagenzien:

1. Chemisch reine konzentrierte Schwefelsäure.
2. 30%iges Wasserstoffsuperoxyd (Perhydrol *Merck*).
3. Gesättigte Lösung von NaCl, je Liter 50 ccm Natronlauge[2], spezifisches Gewicht 1,33.
4. Bromlauge. Wird auf folgende Weise vorbereitet:

A. Auf je 100 ccm NaOH, spezifisches Gewicht 1,33, wurden 10 ccm Brom zugesetzt.

B. Auf je 100 ccm NaOH, spezifisches Gewicht 1,33, wurden 5 ccm Brom zugesetzt.

Alle Reagenzien sollen chemisch rein sein.

Bemerkungen zum Vorbereiten der Reagenzien.

Zu einer Lösung von 350 g NaCl in 1000 ccm Wasser, bis zum Sieden erwärmt, wurden 50 ccm NaOH, spezifisches Gewicht 1,33,

---

[1] *R. Voit*, diese Zeitschr. **169**, 161, 1926.
[2] 400 g NaOH *Merck* in 1 Liter Wasser.



zugesetzt. Die so erhaltene Lösung wird im Kolben aus Jenaer Glas 15 bis 25 Minuten gekocht und während 4 bis 12 Stunden stehengelassen, dann mit Hilfe eines Siphons vom Niederschlag abgehoben, weil sie schwer filtrierbar ist.

Zu 4. 5 bis 10 ccm Brom wurden mit einer Pipette mit Hilfe eines dickwandigen Ballons genommen; nach Befestigung der Pipette im Stativ floß das Brom tropfenweise in den Kolben mit der NaOH-Lösung. Wenn man den Kolben unter die Pipette hält, während dieselbe im Stativ befestigt ist, und derart das Vergießen des Broms vermeidet, so kann man erreichen, daß der Bromgeruch fast nicht zu merken ist. Während der Zusetzung des Broms wird das Kölbchen mit NaOH geschüttelt. Es wurde gar nicht oder mit kaltem Wasser gekühlt. Gleich nach der Bereitung der Lösung wird sie trübe.

Im weiteren verhalten sich die Lösungen A. (100 ccm NaOH + 10 ccm Br) und B. (100 ccm NaOH + 5 ccm Br) verschieden.

A. Am zweiten bis dritten Tage erscheint ein weißer kristallinischer Niederschlag, und die Lösung wird klar. Auch an den folgenden Tagen wird die Bildung des Niederschlags, welcher aus $NaBrO_3$ besteht, beobachtet. Wahrscheinlich zersetzt sich die Lösung nach dem Schema:

$$3\,NaBrO = NaBrO_3 + 2\,NaBr.$$

Überdies ist es sehr leicht möglich, daß die Zersetzung der Lösung nach der Gleichung

$$2\,NaBrO = 2\,NaBr + O_2$$

stattfindet, weil sehr oft der Niederschlag von Gasbläschen bedeckt ist, die sich in unbedeutender Menge absondern[1].

B. Am zweiten bis dritten Tage wird die Lösung klar, indem ein kleiner Niederschlag gebildet wird; wenn sie durch Glaswolle filtriert wird, so bleibt sie klar während einer Woche, später bildet sich wieder ein Niederschlag und eine unbedeutende Gasbildung.

Die Lösungen sollen in dunklem Glas aufbewahrt werden.

Ich benutzte für die Verbrennung kalibrierte Kölbchen von 30 und 50 ccm.

Als Nitrometer wurde der Apparat von *Borodin*[2] gebraucht, der eine Modifikation des Nitrometers von *Lunge* darstellt; er besteht aus

---

[1] *Artmann* und *Skrabal* denken auch, daß die Zerlegung der Bromlauge nach beiden Gleichungen verläuft, nach der zweiten aber recht wenig. Zeitschr. f. analyt. Chem. **46**, 5, 1907.

[2] Ein Apparat derselben Konstruktion, an dem aber der Teil für das Gasvolumen in 0,02 und 0,05 ccm kalibriert ist, wurde nicht zu der Zeit fertig, darum benutzte ich ihn nicht. Man kann annehmen, daß bei kleinen Volumina genauere Resultate erhalten werden.

einer oberen Röhre, die auf 15 ccm kalibriert ist, und einer unteren — von 50 ccm mit Teilungen bis auf 0,1 ccm —, beide Teile sind durch einen Hahn mit zwei Wegen vereinigt, der erlaubt, den oberen mit dem unteren Teil zu verbinden, oder den oberen von dem unteren mit einem Ableitungsröhrchen, oder alle drei Teile voneinander zu trennen. Außerdem gibt es ein ergänzendes Gefäß, um die Flüssigkeiten im Apparate auf Atmosphärendruck zu bringen.

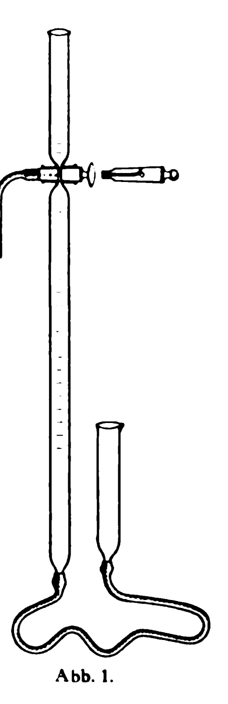


Abb. 1.

Die Bestimmungen werden im allgemeinen nach *Voit* ausgeführt.

1 bis 2 ccm Harn (oder 0,3 bis 1,0 ccm Blut) werden auf einer kleinen Gasflamme in einem Kölbchen von 30 bis 50 ccm mit 1 bis 2 ccm konzentrierter H_2SO_4, in kreisförmigen Bewegungen ununterbrochen geschüttelt, erhitzt. Wenn nach der Verdunstung des Wassers Verkohlung stattfindet und H_2SO_4-Dämpfe sich auf den Wänden des Kölbchen zu konzentrieren beginnen, wird das Kölbchen 2 bis 3 Minuten abgekühlt, darauf setzt man 2 bis 3 Tropfen 30 %igen Wasserstoffsuperoxyds zu. Alsdann — falls man mit Harn arbeitete — erfolgte Entfärbung. Für Blut muß man mehr H_2O_2 zusetzen. Wenn bei nachfolgender Erhitzung wieder die gelbe Farbe erscheint, so soll man noch H_2O_2 zusetzen und wieder erhitzen.

Die Verbrennung wurde für vollkommen gehalten, wenn nach dem Hinzufügen von H_2O_2 beim Erhitzen bis zum Erscheinen der H_2SO_4-Dämpfe an den Wänden des Kölbchens die gelbe Farbe nicht wieder erschien. (Im Falle des Blutes besitzt die Flüssigkeit beim Erwärmen eine schwach gelbliche Farbe, die bei der Abkühlung völlig verschwindet.) Dann setzt man zum abgekühlten Kölbchen 2 ccm Wasser zu und erhitzt bis zum Sieden, damit man sicher sein kann, daß H_2O_2 völlig zerlegt ist, weil es sonst im weiteren Verlauf stören kann. ($NaBrO + H_2O_2 = NaBr + H_2O + O_2$.)

Nach dem Abkühlen (unter dem Wasserstrahl) wird der Inhalt des Kölbchens bis zur Marke ergänzt; daraus entnahm man 15 bis 30 ccm für die Bestimmung.

Wenn der Apparat von *Borodin* mit NaCl gefüllt und sein oberer Teil mit der untersuchten Lösung durchgespült (3 mal mit je 2 ccm) ist, so läßt man 15 ccm dieser Flüssigkeit in den unteren Teil einfließen. Darauf wäscht man den oberen Teil mit Wasser und gießt 10 ccm Bromlauge hinein, welche man zuerst langsam und später, wenn das

stürmische Freiwerden des Stickstoffs etwas ruhiger wird, schnell in den unteren Teil überführt. Das Gefäß mit dem NaCl stellt man so niedrig wie möglich. Nach 1 bis 2 Minuten nimmt man den Apparat aus dem Stativ, sein unteres Ende mit dem Finger dicht zugestopft (die Kautschukröhre wird zur Seite geschoben), und nachdem er in die Horizontallage gebracht ist, zwingt man das ausgeschiedene Gas, in die Mitte des Apparats überzugehen. Danach hebt man das Ende des Apparats etwas und erreicht damit, daß das Gas langsam emporsteigt, wobei man die Flüssigkeit stark schüttelt. Dann bringt man den Apparat schnell in die vertikale Lage und entfernt den Finger vom unteren Ende; noch eine gewisse Menge des Gases wird abgesondert. Diese Operation wiederholt man noch einmal, indem man stärker schüttelt, man muß aber vorsichtig sein, damit die Bromlauge nicht in die Kautschukröhre kommt, weil dort wahrscheinlich ihre Zersetzung stattfindet, was man aus einer unbedeutenden, aber dauernden Gasbildung schließen kann. Nach Beendigung der Gasbildung (2 bis 3 Minuten nach dem Schütteln) werden die kleinen Bläschen, die an den Wänden des Apparats haften, durch Klopfen an der Wand abgetrennt, oder man bringt den Apparat in die horizontale Lage und zwingt in dieser Weise das Gas, einige Male die Wände zu umspülen. Dann stellt man den Apparat in das Stativ und läßt langsam aus seinem oberen Teil 3 ccm H_2O von Zimmertemperatur einfließen, damit der Wasserdampfdruck im Apparat dem Dampfdruck des reinen Wassers entspricht und das gebildete Gas dessen Temperatur annimmt.

Nach 3 Minuten wird die Ablesung bei gleichem Niveau in den beiden Teilen des Apparats vorgenommen.

Bei der Ablesung arbeitete ich mit dem *Bergmann*schen Diaphragma[1], das von *Treadwell*[2] für die Büretten empfohlen wird; ich stellte hinter diesem eine matte Glasplatte auf, was die richtige Augenstellung und Deutlichkeit des Meniskus verursachte.

Bemerkungen zum Gange der Bestimmung.

1. *R. Voit* empfiehlt, 0,5 ccm Harn mit 1 ccm H_2SO_4 zu verbrennen. Die Flüssigkeit wird nach der Verbrennung und Zusetzung von 3 ccm H_2O in den Apparat übergeführt, das Kölbchen 2- bis 3 mal mit Wasser gespült, welches auch dort hineinfließt.

Ich fand es bequemer, die Flüssigkeit nach der Verbrennung auf ein bestimmtes Volumen zu bringen und schon dann eine bestimmte Menge davon in den Apparat zur Bestimmung zu bringen, weil 1. die Flüssigkeit nach der Verbrennung sich leicht mit NaCl-Lösung ver-

---

[1] Es ist ein matter, schwarzer, hölzerner Halter für Probiergläschen.
[2] l. c.



mischt und zu Boden sinkt, was die Konzentration der Lösung, die der Wirkung der Bromlauge unterworfen wird, sehr herabsetzt. In meinem Falle verläuft die Reaktion zumeist über der NaCl-Lösung, und erst nach dem Schütteln wird die Flüssigkeit mit der letzten vermischt.

2. Was das Schütteln anbetrifft, so stimme ich mit *Voit* völlig überein, daß es unbedingt notwendig ist, um eine vollkommene und schnelle Stickstoffabsonderung hervorzurufen, weil im entgegengesetzten Falle die Gasbildung sehr verlangsamt wird und man zu Resultaten kommt, die nicht untereinander stimmen.

3. Hinsichtlich der Zeit, die man warten muß, bevor man die Ablesung machen darf, sind die Meinungen weit verschieden. So z. B. gibt *Salkowski*[1] 30 Minuten an, *Colquhoun*[1] 20 Minuten, *Treadwell*[2] 10 Minuten, *Dehn* 10 Minuten, während *Doremus*[1] 3 bis 4 Minuten für ein gutes Hypobromit für genügend hält. *Voit*[2] und *Stehle*[3] machen die Ablesung einige Minuten nach der Beendigung der Gasbildung. Es ist klar, daß diese Zeit von der Menge des ausgeschiedenen Gases abhängt, sowie auch von anderen Bedingungen.

Ich überzeugte mich durch direkte Versuche, daß bei den oben geschilderten Bedingungen 3 Minuten genügend sind. Das ist aus der folgenden Tabelle ersichtlich.

Tabelle I.

Volumen des frei gewordenen Stickstoffs nach der Beendigung der Gasausscheidung aus der Flüssigkeit.

Nach 3 Min. ccm	Nach 10 bis 30 Min. ccm	Nach 12 Stunden ccm	
5,30	5,30	—	Neue *p* und *t* berücksichtigt.
1,93	—	1,93	
3,81	3,81	—	
5,22	5,21	5,21	
5,34	5,34	—	
5,42	—	5,42	

4. Die Ablesung wird bei gleichem Niveau der Flüssigkeit in beiden Teilen des Apparats gemacht. Eigentlich ist das nicht ganz richtig, denn es gibt eine gewisse Verschiedenheit in den Flüssigkeitsdichten,

[1] Zitiert nach *Dehn*, l. c.

[2] l. c.

[3] *R. Stehle*, Journ. of biol. Chem. 45, 223, 1920/21; Chem. Centralbl. 1921, II, 557.



und man sollte das Volumen des Gases etwas vergrößern; diese Korrektur ist aber sehr unbedeutend und ist völlig dadurch kompensiert, daß die Menge des Gases, die im Blindversuch gebildet wird, genau dieser Korrektur entspricht (0,01 bis 0,02 ccm).

Die Berechnung der gewonnenen Resultate wird nach der Formel

$$g = 1{,}2505 \cdot \frac{v}{1 + 0{,}00367 \, . \, t} \cdot \frac{p - p_w}{760}$$

gemacht, wobei g das Stickstoffgewicht der zur Analyse genommenen Substanzmenge in Milligrammen, v die Menge des ausgeschiedenen Stickstoffs, p_w Wasserdampfdruck bei den Versuchsbedingungen darstellt. Man kann auch fertige Tabellen benutzen (Tabelle im Chemikerkalender von 1921, S. 272, und in der Arbeit von *Voit*).

Die ersten Versuche wurden mit Harn und Blut gemacht, später mit einer Lösung von schwefelsaurem Ammoniak („zur Analyse" *Kahlbaum*). In den folgenden Tabellen sind die Resultate der Bestimmungen angeführt.

Tabelle II.

Ammonium sulfuricum.

10,01 mg N in 1 ccm. (Theoretisch ebenso wie nach *Kjeldahl* und nach den H_2SO_4-Bestimmungen.) Resultate berechnet auf 1 ccm $(NH_4)_2SO_4$.
Bedingung: 2 ccm $(NH_4)_2SO_4$ + 2 ccm H_2SO_4 bis 50 ccm H_2O.
Davon zur Bestimmung 15 ccm.

Frische Bromlauge		Bromlauge, die gestanden hat	
Gefunden mg	Abweichung von *Kjeldahl* %	Gefunden mg	Abweichung von *Kjeldahl* %
10,04	+ 0,3	10,26	+ 2,5
10,01	0,	10,28	+ 2,7
10,03	+ 0,2	10,28	+ 2,7
10,10	+ 1,0	10,29	+ 2,8
10,04	+ 0,3	10,28	+ 2,7
10,13	+ 1,3	10,28	+ 2,7
10,07	+ 0,7	10,29	+ 2,8
10,13	+ 1,3	10,28	+ 2,7
Mittel: 10,068	+ 0,58	10,28	+ 2,7

Die Versuche mit Harn wurden zu der Zeit ausgeführt, als die Methodik der Bestimmungen noch nicht ausgearbeitet wurde. Gerade während dieser Versuche wurde die Abhängigkeit der Resultate vom Alter wie von der Bromlaugezusammensetzung festgestellt,

was bei Versuchen mit $(NH_4)_2SO_4$-Lösung ganz deutlich wurde. Darum sind die Zahlen der Tabelle III nicht so maßgebend wie in der Tabelle II.

Tabelle III.

Harn.

1 bis 2 ccm Harn + 1 bis 2 ccm H_2SO_4. Nach der Verbrennung bis auf 30 bis 50 ccm verdünnt, daraus für die Bestimmung 15 ccm genommen.

N-Gehalt in mg in 1 ccm		Zahl der Bestimmungen	Abweichungen einzelner Bestimmungen mittlerer Größe %	Abweichungen von *Kjeldahl* %
Nach *Kjeldahl* Mittel aus zwei Bestimmungen	Gefunden			
5,54	5,56	2	± 1,8	+ 0,4
5,95	5,87	4	± 1,2	— 1,3
6,06	5,98	2	± 1,3	— 1,3
6,58	6,44	2	± 0,3	— 2,1
7,23	7,24	4	0	+ 0,15
10,54	10,54	2	± 0,8	0

Tabelle IV.

Blut.

0,5 bis 1 ccm Blut, 2 ccm H_2SO_4, verdünnt bis auf 50 ccm;
0,3 ccm Blut + 1,2 ccm H_2SO_4, verdünnt bis auf 30 ccm.
Für die Bestimmung wurden 15 ccm genommen.

N-Gehalt im mg in ccm		Abweichungen		N-Gehalt im mg in ccm		Abweichungen	
Nach *Kjeldahl* mg	Gefunden mg	Von der mittl. Größe %	Von *Kjeldahl* %	Nach *Kjeldahl* mg	Gefunden mg	Von der mittl. Größe %	Von *Kjeldahl* %
32,30	32,26	—	— 0,12	28,85	29,10	—	+ 0,87
	32,48	+ 0,43	+ 0,56		—	—	—
	32,48	—	+ 0,56		29,05	—	+ 0,70
	32,18	—	— 0,37		—	—	—
	32,14	— 0,62	— 0,49		—	—	—
	32,44	—	+ 0,43		—	—	—
	32,40	—	+ 0,31		—	—	—
Mittel:	32,34		—	—	29,075	± 0,08	—

Außerdem wurden spezielle Versuche ausgeführt im Bestreben, folgende Fragen zu lösen:

1. Die Genauigkeit der Bestimmungen in Abhängigkeit von der N-Konzentration in der untersuchten Flüssigkeit.

2. und 3. Der Einfluß der verschiedenen Zubereitungsmethoden und des Alters der Bromlauge auf die Genauigkeit der Bestimmung.

4. Die Möglichkeit, mehr als 15 ccm für die Bestimmung zu nehmen im Falle einer niedrigen N-Konzentration.

Folgende Tabellen geben eine Antwort auf diese Fragen.

Tabelle V.

1. Der Einfluß der N-Konzentration in der untersuchten Flüssigkeit.

$(NH_4)_2SO_4$				Harn			
N-Gehalt in 1 ccm mg	Gefunden mg	Zahl d. Bestimmungen	Abweich. v. *Kjeldahl* %	N-Gehalt in 1 ccm mg	Gefunden mg	Zahl d. Bestimmungen	Abweich. v. *Kjeldahl* %
25,025	24,88	1	− 0,58	—	—	—	—
20,01	20,19	1	+ 0,90	—	—	—	—
10,01	10,16	8	+ 1,5	10,53	10,54	2	+ 0,1
5,005	5,35	6	+ 7,0	5,54	5,56	2	+ 0,4
3,34	3,70	2	+ 10,8	—	—	—	—

Tabelle VI.

2. und 3. Einfluß der verschiedenen Methoden der Zubereitung und des Alters der Bromlauge.

Die Lösungen wurden in folgender Weise vorbereitet:

A : 100 ccm NaOH, spez. Gew. 1,33, + 10 ccm Br_2, ohne Abkühlung,
A_1: 100 „ NaOH, „ „ 1,33, + 10 „ Br_2, unter Abkühlung mit Eis,
B : 100 „ NaOH, „ „ 1,33, + 5 „ Br_2, ohne Abkühlung.

Die Lösungen A und A_1 wurden vor dem Gebrauch mit dem gleichen Volumen NaOH verdünnt, da sie sich im entgegengesetzten Falle zu leicht im Apparat mit NaCl vermischen.

Ammonium sulfuricum.

Bedingungen wie in Tabelle II, Resultate berechnet auf 1 ccm $(NH_4)_2SO_4$. 1 ccm enthält 10,01 mg N.

Bestimmungen, ausgeführt nach Bereitung der Bromlauge nach	Bromlauge					
	A mg	Zahl der Bestimmungen	A_1 mg	Zahl der Bestimmungen	B mg	Zahl der Bestimmungen
1 bis 24 Std.	10,03	2	10,06	1	10,09	3
2 „ 3 Tage	10,23	4	10,28	2	—	—
4 „ 5 „	10,28	1	10,28	1	10,28	1
2 Monate	8,2	2	—	—	—	—
3 „	—	—	4,25	—	—	—

Bemerkungen. Voit[1] rät, auf 10 ccm 40%iger NaOH 1 ccm Brom zu nehmen und die Lauge gleich nach der Bereitung zu gebrauchen.

Ich gebe dem Gegenteil den Vorzug, nämlich, eine Lauge mit einem niedrigeren Gehalt von Brom in einer schwächeren NaOH-Lösung (30%) zu nehmen und sie 2 bis 3 Tage nach der Bereitung zu gebrauchen.

Die Lauge A wurde vorbereitet, da nach *Dehn*[1] Lösungen solcher Konzentration haltbar sind und gute Resultate geben, unabhängig,

[1] l. c.

ob sie mit oder ohne Abkühlung bereitet sind. Für verdünnte Hypobromitlösungen (0,1 n) fand *B. Pohorecka-Lelesz*[1] sogar, daß nur dasjenige Hypobromit gute Resultate gibt, das unter Abkühlung mit Eis bereitet ist.

Wir haben oben von der Zersetzung der A-Lösung gesprochen. Wie man aus der Tabelle ersieht, macht sich der Einfluß der Abkühlung nicht geltend.

Die Vorzüge der Lösung B vor der nicht verdünnten Lösung A lassen sich aus folgenden Versuchen ersehen.

Tabelle VIa.

$(NH_4)_2SO_4$-Lösung und Bedingungen wie in der Tabelle II.
Milligramm Stickstoff gefunden vor und nach der Absorption mit Pyrogallol (s. S. 211 bis 212).

	Lösung A				Lösung B			
	Frisch mg	Zahl der Bestimmungen	Gestanden mg	Zahl der Bestimmungen	Frisch mg	Zahl der Bestimmungen	Gestanden mg	Zahl der Bestimmungen
Vor Absorption mit Pyrogallol	9,75	1	9,84	2	10,0	1	10,15	2
Nach der Absorption	9,57	1	9,66	2	9,82	1	9,98	2

Tabelle VII.

4. Die Möglichkeit, für die Bestimmung mehr als 15 ccm zu nehmen. Bedingungen: Tabelle III. Für die Bestimmung 25 bis 30 ccm genommen.

N-Gehalt in 1 ccm			
Nach *Kjeldahl* mg	Gefunden mg	Zahl der Bestimmungen	Abweichungen %
6,58	6,44	2	— 2,1
7,23	7,24	2	+ 0,15

Aus der Tabelle II können wir folgende Schlüsse ziehen:

1. Bei gegebenen Bedingungen gibt die N-Bestimmung mit Hilfe der Bromlauge Zahlen, die nahe den theoretischen sind, sie übersteigen sie jedoch etwas.

2. Eine Bromlauge, die etwas gestanden hat, gibt höhere und besser übereinstimmende Werte als die frisch bereitete. Der erste Schluß widerspricht der allgemein angenommenen Meinung, einige Bestätigungen findet man jedoch in der Literatur, z. B. *Stehle*[1] zeigte, daß

[1] l. c.

im Vakuum über dem Quecksilber die theoretische Gasmenge ausgeschieden wird. *Margosches* und *Rose*[1] erhielten mit Hilfe ihrer alkalimetrischen Methode für die Lösungen von $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3 und NH_4Cl Zahlen, die um 1 bis 2,8% höher als die theoretischen waren (N-Konzentration von 13 bis 30 mg). Mit der Steigerung der Konzentration verminderte sich der Fehler und ging in eine negative Größe über (s. Tabelle V).

Zu 2. Die meisten Forscher arbeiteten mit frischer Bromlauge, weil sie diese für die beste hielten. Aber *Dehn*[1] zeigte, daß die Bromlauge, die einige Tage gestanden hat, mehr Gas entwickelt als die frische. Meine Versuche bestätigen diese Beobachtung völlig.

Doch bleibt es völlig unverständlich, weshalb sich mehr Gas bildet, als nach der Theorie entstehen soll. Mehrere Autoren (*Schenk*[1], *Pflüger*[1], *Falk*[2], *Quinquand*[3] und *Krogh*[2]) stellten fest, daß, je alkalischer die Bromlauge ist, desto mehr Gas sie entwickelt. Im besten Falle aber bekam *M. Krogh* 100% der Theorie. Tabelle V erlaubt zu vermuten, daß dem frei werdenden Stickstoff eine gewisse Menge eines fremden Gases beigemischt ist, welches die Unvollkommenheit der Reaktion kompensiert, wodurch bei niedriger Stickstoffkonzentration der Fehler rasch positiv wird und sehr rasch steigt. Der Umstand, daß Hypobromitlösungen sich nach der Gleichung

$$2\,NaBrO = 2\,NaBr + O_2$$

zersetzen können, wobei diese Zersetzung recht langsam im Dunkeln vonstatten geht und energischer im Lichte (*Treadwell*[4]) von einer ganzen Reihe von Katalysatoren beschleunigt werden kann (*Smith*[5]), wie z. B. von Kobaltsalzen, $CuSO_4$, (*Stehle*[6]) und anderen, läßt daran denken, daß dieses Plus aus Sauerstoff besteht. Die Versuche, die zu diesem Zwecke gemacht wurden, bestätigen diese Vermutung völlig.

Stehle bemerkte bei der Stickstoffbestimmung mit Bromlauge im Apparat von *van Slyke* eine merkliche O_2-Entwicklung, erklärte sie aber durch den Einfluß von $CuSO_4$, mit welchem er die Verbrennung ausgeführt hatte.

Folgende Versuche zeigen den Einfluß von $CuSO_4$ auf die Zersetzung der Bromlauge.

---

[1] l. c.
[2] Nach *M. Krogh*, l. c.
[3] Nach *Hamburger*, Zeitschr. f. Biol. 20, 303, 1884.
[4] *Treadwell*, Lehrb. d. analyt. Chem. 1.
[5] *A. Smith*, Introduction to inorganic chemistry, 1909.
[6] l. c. und Journ. of biol. Chem. 47, 13, 1921.

Tabelle VIII.

Nr.	Genommen		Gasentwicklung nach		
	Bromlauge ccm	0,5 % $CuSO_4$ ccm	1 Stunde ccm	2 Stunden ccm	3 Stunden ccm
1	10	5	6	13	22
2	15	15	30	35	41,6

Nach dem Hinzufügen (2,5 ccm im ersten Versuch und 1 ccm im zweiten) einer starken Lösung von Pyrogallol im Apparat verminderte sich das Gasvolumen im ersten Versuch bis auf 1,4 ccm, im zweiten bis auf 0,9 ccm.

Diese Menge des nicht absorbierten Gases wurde in ein Röhrchen übergeführt, das mit dem Reagenz für die Absorption von Kohlenstoffmonoxyd ($Cu_2Cl_2 + HCl$), welches bei der Absorption von O_2 vom Pyrogallol ausgeschieden sein konnte, eingeführt wurde. Das Gasvolumen verminderte sich ungefähr um zwei Drittel. Der Rest wurde nicht untersucht.

Dann wurden Versuche mit derselben Lösung von $(NH_4)_2SO_4$ wie früher gemacht, indem man in den Apparat nach der Beendigung

Tabelle IX.

Wirkung des Pyrogallols auf das Gas bei der Reaktion von $(NH_4)_2SO_4$ mit Bromlauge.

Bedingungen wie in Tabelle II. Nach der Ablesung wurden 0,5 bis 1,0 ccm der Pyrogallollösung eingeführt, nach diesem 1 bis 3 ccm H_2O. $(NH_4)_2SO_4$ enthält in 1 ccm a) 10,01 mg N, b) 5,005 mg N, c) 25,025 mg N.

Vor der Pyrogallolzusetzung mg	Abweichungen von der theoret. Zahl %	Nach der Pyragallolzusetzung mg	Abweichungen %	Absorbiert durch Pyrogallol ccm	Absorbiert durch Pyrogallol %	Alter des Hypobromits
10,01	0	9,83	— 1,8	0,1	— 1,8	} 1 bis 12 Std.
9,92	— 0,9	9,72	— 2,9	0,11	— 2,0	
10,00	— 0,1	9,82	— 1,9	0,10	— 1,8	
10,01	0	9,80	— 2,1	0,11	— 2,1	} 1 Tag
10,02	+ 0,1	9,80	— 2,1	0,12	— 2,1	
10,15	+ 1,4	9,97	— 0,4	0,10	— 1,8	2 Tage
10,13	+ 1,2	9,95	— 0,6	0,10	— 1,8	} 3 „
10,15	+ 1,4	9,98	— 0,3	0,10	— 1,7	
10,15	+ 1,4	9,97	— 0,4	0,10	— 1,8	
10,14	+ 1,3	9,97	— 0,4	0,09	— 1,7	} 4 „
10,14	+ 1,3	9,96	— 0,5	0,11	— 1,8	
5,33	+ 6	5,14	+ 2,5	0,10	— 3,5	} 1 bis 12 Std.
5,18	+ 3,9	5,00	— 0,1	0,10	— 4	
24,88	— 0,58	24,75	— 1,1	0,07	— 0,52	—

Tabelle IXa.

N-Bestimmung im Blut und Harn. Bedingungen: 0,3 ccm Blut verdünnt nach der Verbrennung bis auf 30 ccm, 2,0 ccm Harn verdünnt nach der Verbrennung bis auf 50 ccm. Man nahm für die Bestimmung 15 ccm der erhaltenen Lösung.

Nr.	Untersuchte Substanz	N-Gehalt in 1 ccm nach *Kjeldahl* mg	N gefunden		Abweichungen von *Kjeldahl* %	Von Pyrogallol absorbiertes Gas ccm
			Vor der Absorption mit Pyrogallol	Nach der Absorption mit Pyrogallol		
1	Harn	12,0	12,02	11,84	— 1,3	0,10
2	„	12,0	12,04	11,86	— 1,2	0,10
3	„	8,36	8,46	8,25	— 1,3	0,10
4	„	8,36	8,44	8,23	— 1,5	0,10
5	„	8,36	8,46	8,25	— 1,3	0,10
6	Blut	28,85	29,38	28,63	— 0,77	0,10
7	„	28,85	29,38	28,63	— 0,77	0,10

der Gasentwicklung und der Ablesung 0,5 bis 1,0 ccm einer starken Pyrogallollösung in Natronlauge[1] einführte.

Resultat: In allen Fällen erreicht man mit Pyrogallol im Durchschnitt eine Absorption von 0,1 ccm Gas.

In der Tabelle IX sind die Resultate dieser Versuche angeführt.

Um sicher zu sein, daß die Gasvolumenveränderung durch die Anwesenheit von O_2 hervorgerufen ist, wurden einige Versuche gemacht. Reiner Stickstoff[2], ebenso wie das bei der Reaktion mit Bromlauge gewonnene Gas wurde in einem anderen Apparat über Quecksilber gesammelt und davon in den Apparat von *Borodin*, mit NaCl oder Quecksilber gefüllt, übergeführt (streng beobachtet, daß keine Luft in den Apparat eindringt). Resultate siehe Tabelle X.

Tabelle X.

Für den Versuch genommen	Gasvolumen ccm	Eingeführt		Gasvolumen ccm	Über	Pyrogallol absorbiert
		Pyrogallol ccm	H_2O nach ihm ccm			
Stickstoff	10,54	0,5	0,5	10,54	NaCl-Lösung	0,0
Gas von der Reaktion mit Bromlauge .	5,52	0,5	0,5	5,42	NaCl-Lösung	0,1
Stickstoff	10,31	0,1	0,3	10,31	Quecksilber	0,0
Gas von der Reaktion mit Bromlauge .	5,54	0,1	0,5	5,44	Quecksilber	0,1

[1] Wird von *van Slyke* für die O_2-Bestimmung im Blute empfohlen. Das Pyrogallol wird langsam mit einigen Intervallen eingeführt.

[2] Erzeugt durch das Erhitzen von $KNO_2 + (NH_4)_2SO_4 + K_2CrO_4$-Gemisch, durchgeleitet durch $K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4$ und alkalische Lösung des Pyrogallols.

Außerdem wurden Versuche mit der Absorption des bei der Reaktion genommenen Gases durch Phosphor in einer *Hempel*schen Pipette gemacht. Dabei wurde eine deutliche Bildung von weißen Dämpfen beobachtet (qualitative Reaktion auf Sauerstoff); die Absorption war von derselben Dimension, wie bei Pyrogallol. Folgen einige Versuche.

Tabelle XI.

Absorption durch Phosphor.

Gasvolumen	
Vor der Absorption ccm	Nach der Absorption ccm
5,55	5,45
5,20	5,10
5,38	5,28

Was den O_2-Ursprung anbetrifft, darf man folgende Vermutungen machen: a) er wird im Verlauf der Bromlaugenzersetzung nach der oben zitierten Formel gebildet, oder b) es ist der in den Reagenzien gelöste Luftsauerstoff, der aus ihnen bei der Reaktion ausgeschieden ist.

Eine gewisse Stütze der zweiten Vermutung könnte der Umstand geben, daß starkes Schütteln und die Durchleitung des gebildeten Stickstoffs (wobei der Sauerstoffpartialdruck gleich 0 ist) durch die ganze Schicht der Reagenzien, die sich im Apparate befindet, die Ausscheidung des in ihm gelösten Sauerstoffs verstärkt.

Aber der Versuch lenkt diese Annahme, daß der Sauerstoff aus den Reagenzien im Apparat (außer dem Hypobromit) stammt, ab. In demselben Apparat über Quecksilber wurden kleine Mengen (0,3 bis 0,5 ccm) der wässerigen Ammoniaklösung der Wirkung der Bromlauge ausgesetzt. Das gebildete Gas zeigte bei Pyrogalloleinwirkung Volumverminderung derselben Größenordnung wie in früheren Versuchen[1]. In der Tabelle XII sind die zwei entsprechenden Versuche angeführt.

Tabelle XII.

Genommen		Volumen des gebildeten Gases	Volumen des Gases nach Pyrogallol und H_2O-Einf.	Volumenverminderung ccm	Bemerkungen
NH_4OH ccm	Bromlauge ccm				
Etwa 0,3	10	6,38	6,30	0,08	Die Versuche sind über Quecksilber ausgeführt.
„ 0,5	10	9,02	8,91	0,11	

[1] Nach den Angaben *Stehles* (l. c.) ist die Löslichkeit der Luft in Hypobromit gleich 0,006 bis 0,005 ccm.

Die hier angeführten Versuche geben die Möglichkeit, zu dem Schluß zu kommen, daß bei der Reaktion des $(NH_4)_2SO_4$ und des Ammoniaks mit der Bromlauge außer dem Stickstoff noch eine gewisse Menge Sauerstoff gebildet wird, wahrscheinlich als Folge der Zersetzung des Hypobromits nach der oben angeführten Gleichung. Diese kleine Menge Sauerstoff stellt bei kleinen Volumen des gebildeten Gases eine relativ bedeutende Menge dar und kompensiert völlig die Unvollkommenheit der Reaktion, übertrifft sogar die theoretischen Zahlen. Bei der Vergrößerung der Stickstoffmenge bildet die frei gewordene Menge Sauerstoff einen relativ kleinen Prozentsatz, und die Unvollkommenheit der Reaktion läßt sich daraus ersehen, daß der Fehler negativ wird.

Von diesem Punkte aus ist es möglich, die oben angeführten Resultate der Versuche von *Margosches* und *Rose* mit den Ammoniumsalzen zu erklären. Nach ihrer alkalimetrischen Methode wurden eigentlich die Mengen des $NaBrO$ und $NaBrO_3$ bestimmt, die sich vor und nach der Reaktion in der Bromlauge befanden. Die Differenz dieser Menge ergibt die Bromlaugenmenge, die in der Reaktion verbraucht ist. Aber diese Größe, außer der Bromlauge, die wirklich an der Reaktion teilnahm, enthält noch eine gewisse Menge derselben, die unter Sauerstoffausscheidung zerfallen ist und welche bei der Analysenberechnung Fehler hervorruft. Bei kleinen Konzentrationen des Stickstoffs ist der letzte verhältnismäßig groß und positiv, bei den größeren negativ. Die Resultate der Versuche von *Margosches* und *Rose* bestätigen diese Vermutung.

In der Arbeit derselben Verfasser[1] ist nachgewiesen, daß *Hüfner*[2] (1871), der das Gas, welches bei der Wirkung der Bromlauge auf Harnstoff bei 60 bis 70° gebildet wird, studierte, darin außer Stickstoff eine unbedeutende Beimischung von Sauerstoff fand.

L. Ambard[3] weist in seiner Arbeit über die Harnstoffbestimmung im Blute und Harn mit Hilfe der Bromlauge auch auf Sauerstoffausscheidung bei dieser Reaktion hin und teilt sie in die vermeidliche und unvermeidliche. Die erste wird unter dem Einfluß des Quecksilbers beobachtet, besonders des schmutzigen, auch des $CuSO_4$. Doch auch in Abwesenheit dieser Substanzen wird die Ausscheidung einer gewissen Menge von O_2 beobachtet, welche der Verfasser für eigen der Reaktion selbst und daher unvermeidlich hält. Die Menge des gebildeten Sauerstoffs in einem gewissen Bereich der Harnstoffkonzentration (von 4 bis 12 mg) bleibt konstant und vermindert sich außerhalb dieser Grenzen (s. Tabelle IX).

Aus diesen Gründen hält *Ambard* für möglich, keine Sauerstoffabsorption auszuführen[4], sondern von dem Volumen des gebildeten Gases 0,20 ccm abzuziehen (das Volumen des dabei frei gewordenen Sauerstoffs). Die so erhaltene Größe beträgt nach den Versuchen des Verfassers 90% der

---

[1] l. c.

[2] *Hüfner*, Zeitschr. f. analyt. Chem. 1871, S. 486.

[3] *L. Ambard*, Dosage de l'urée par l'hypobromite de soude. Presse medic. **70**, 753, 1923. In derselben Arbeit gibt es eine Beschreibung des Mikroureometers für die Bestimmung kleiner Mengen Harnstoff. Ich wurde mit dieser Arbeit erst am Ende meiner Untersuchung bekannt.

[4] Wurde von ihm mit Hilfe des Hydrosulfits ausgeführt.

theoretischen Menge des Stickstoffs und soll entsprechend vergrößert sein. (Bei der Harnstoffbestimmung im Blute mit dem Mikroureometer des Verfassers beträgt die Stickstoffausscheidung 100 bis 97 % der theoretischen Menge.)

Wenn man eine Korrektur auf Sauerstoffausscheidung nicht anbringt oder nicht beachtet, daß bei den von *L. Ambard* beschriebenen Bedingungen die Stickstoffmenge 90 % der theoretischen beträgt, bekommt man falsche Resultate. Wenn z. B. das frei gewordene Gas für einen reinen Stickstoff gehalten und dabei eine 10 %ige Zugabe für die unvollständige Ausscheidung gemacht wurde, so erhielt der Verfasser bei dem Gehalt an Harnstoff von 16 mg in der untersuchten Flüssigkeit einen Fehler von + 2,0 % und bei 4 mg Harnstoff + 11 % (s. Tabelle V).

Umgekehrt, ohne Korrektur für O_2-Bildung und für die Unvollkommenheit der Stickstoffausscheidung, bekam der Verfasser bei einem Gehalt an Harnstoff von 16 mg einen Fehler von — 8 % und bei 4 mg + 2,0 % (s. dieselbe Tabelle).

Man sieht aus dem Gesagten, daß die Resultate meiner Versuche der Stickstoffbestimmung und die *Ambards* — über die Harnstoffbestimmung mittels Bromlauge — im wichtigsten zusammenfallen in dem Teile, wo die Rede von der O_2-Ausscheidung bei der Reaktion ist, und der Notwendigkeit, Korrekturen für diese Ausscheidung anzuwenden, die in einem gewissen Bezirk der Konzentrationen der untersuchten Substanz eine konstante Größe darstellt.

Bei den von mir beschriebenen Bedingungen ist die Stickstoffausscheidung vollkommen, sie beträgt 98,5 bis 99,5 % der theoretischen Menge. *Ambard* spricht nicht von dem Einfluß des Alters der Bromlauge auf die Resultate der Bestimmung.

Zusammenfassung.

1. Bei den oben angedeuteten Bedingungen kann man, wenn für die Verbrennung 30 % H_2O_2 gebraucht wird und als Nitrometer der Apparat von *Borodin*, eine Stickstoffbestimmung in kleinen Mengen von Blut und Harn ausführen; dabei ist der Fehler bei Stickstoffkonzentrationen von 30 bis 8 mg nicht höher als $\pm$ 3,0 %.

2. Eine Bromlauge, die gestanden hat, gibt größere und besser übereinstimmende Zahlen, als eine frisch bereitete.

3. Bei höheren Stickstoffkonzentrationen ist der Fehler bei der Bestimmung meistenteils negativ, bei der Konzentrationsverminderung wird er — durch Null gehend — positiv und wächst rasch.

4. Die Ursache dieser Erscheinung ist der Umstand, daß mit dem Stickstoff zusammen eine kleine Menge Sauerstoff ausgeschieden wird, die für kleine Volumina des gebildeten Gases einen relativ großen Fehler gibt.

5. Nach der Sauerstoffabsorption durch Pyrogallol wird die wahre Menge des gebildeten Stickstoffs erhalten, welche zeigt, daß die Reaktion

des Ammoniaks mit der Bromlauge nicht quantitativ verläuft, sie ist vollkommener mit der Bromlauge, die gestanden hat.

6. Darum, um zuverlässige Zahlen zu erreichen, empfiehlt man, eine Bromlauge zu gebrauchen, die 2 bis 5 Tage gestanden hat und filtriert ist[1], und für kleine und mittlere Volumina (1 bis 7 ccm) des ausgeschiedenen Gases soll man nach der Reaktion Pyrogallol einführen. (Der Fehler bei N-Konzentrationen von 30 bis 5 mg N ist $\pm$ 1 bis 2,5 %). Bei größeren Volumina ist der Fehler negativ und Pyrogalloleinführung überflüssig.

7. Bei genannten Bedingungen (für die Analyse 1 ccm Harn oder 0,3 ccm Blut genommen, nach der Verbrennung bis auf 30 ccm verdünnt, oder 2 ccm Harn und 0,5 ccm Blut bis auf 50 ccm) wird der Maximalfehler für Harn $\pm$ 2,5 %, der mittlere $\pm$ 1,0% und für Blut-Maximalfehler $\pm$ 1,0% und der mittlere $\pm$ 0,5 %.

8. Man soll aber nicht vergessen, daß die Zersetzung des Hypobromits von einer Reihe von Katalysatoren beschleunigt werden kann und seine Prüfung mit Hilfe von Pyragallol dann nicht überflüssig wird.

Zum Schlusse will ich hier meinen Dank dem Direktor der Abteilung, Prof. *S. S. Salaskin*, und seinem Assistenten, *P. A. Aschmarin*, für das angebotene Thema, ebenso wie für zahlreiche Ratschläge und Hinweise, die mir während der Arbeit gegeben wurden, aussprechen.

[1] Sie bleibt unverändert während einer Woche, vielleicht auch länger.

Über die antiseptische Wirkung des Phenols und des p-Chlorphenols in Lösungsmitteln verschiedener Dielektrizitätskonstante[1].

Von

W. E. Engelhardt.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 27. September 1927.)

In einer früheren Arbeit von *W. Hellenbrand* und *G. Joachimoglu*[2] wurde für die antiseptische Wirkung des Sublimats in verschiedenen Lösungsmitteln folgende Arbeitshypothese aufgestellt: „Besteht zwischen elektrolytischer Dissoziation und antiseptischer Wirkung einer Sublimatlösung ein Parallelismus, d. h. steigt mit der elektrolytischen Dissoziation die antiseptische Wirkung an, so darf das Sublimat in Lösungsmitteln niedriger Dielektrizitätskonstante, was (nach *Nernst* und *Thomson*[3]) eine geringere Dissoziation bedingt, nicht antiseptisch wirken.“ Es gelang, diese Hypothese experimentell zu stützen, indem nachgewiesen wurde, daß das Sublimat in Lösungsmitteln niederer Dielektrizitätskonstante (Chloroform, Benzol, Äther) keine antiseptische Wirkung entfaltet, während in Lösungsmitteln mit hoher Dielektrizitätskonstante (Nitrobenzol, Glycerin, Wasser) eine antiseptische Wirkung vorhanden ist. Den gleichen Beweis erbrachten *Joachimoglu* und *Klissiunis*[4] für das Quecksilberbromid (nur das Chloroform bildete hier eine Ausnahme) und *Klissiunis*[5] für das Cuprichlorid (allerdings in meist anderen Lösungsmitteln als in den vorher zitierten Arbeiten und in der vorliegenden Arbeit verwandt wurden. Er fand Desinfektionswirkung in Wasser, Glykol, Methyl- und Äthylalkohol, dagegen keine in Aceton, Propyl-, Isopropyl- und Isoamylalkohol.)

Die folgenden Versuche habe ich auf Veranlassung von Prof. *Joachimoglu* ausgeführt. Sie bilden eine Fortsetzung der oben angeführten Arbeiten und beschäftigen sich mit der antiseptischen

[1] Vorgetragen auf der 7. Tagung der Deutschen pharmakologischen Gesellschaft in Würzburg am 23. September 1927.

[2] *Hellenbrand* und *Joachimoglu*, diese Zeitschr. **153**, 131, 1924.

[3] *Nernst*, Theoret. Chem., 8. Aufl., 1921, S. 366.

[4] *Joachimoglu* und *Klissiunis*, diese Zeitschr. **153**, 142, 1924.

[5] *Klissiunis*, ebendaselbst **159**, 107, 1925.

Wirkung des Phenols und des p-Chlorphenols in Lösungsmitteln verschiedener Dielektrizitätskonstante. Ausgegangen wurde von der Überlegung, daß bei einer Substanz, die wenig dissoziert (Carbolsäure), die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels die antiseptische Wirkung nicht beeinflussen wird.

Über die Wirkung des Phenols in nichtwässerigen Lösungen liegen bisher in der Literatur wenig Angaben vor. *Koch*[1] machte Versuche mit 1 bis 5%igen Lösungen in Olivenöl, welche er auf an Seidenfäden angetrocknete Milzbrandsporen mit vollkommen negativem Ergebnis einwirken ließ. *Paul* und *Krönig*[2] untersuchten Lösungen von 5% Phenol in Methyl- und Äthylalkohol, fanden aber eine starke Abnahme der Wirkung bei Steigerung des Alkoholgehalts. *Minervi*[3] machte Versuche an Bact. prodigiosum mit 3%iger alkoholischer Phenollösung, fand aber auch keine Wirkungssteigerung, sondern eine Abnahme bei höheren Alkoholkonzentrationen. *Laplace*[4] beobachtete Zunahme der Desinfektionskraft des Phenols durch Säurezusatz, näher untersucht wurden diese Verhältnisse von *Kuroda*[5], welcher ein genaues p_H-Optimum für Phenol und einige Homologen feststellte. Auch eine Wirkungssteigerung durch Salzzusatz (*Heider*[6]) ist bekannt. Eine Verminderung der Wirkung durch Glycerinzusatz beobachteten auch *Paul* und *Krönig* (l. c.). *Frei* und *Kruppski*[7] fanden eine Steigerung der Wirkung durch Zusatz von Äther oder Chloroform, dagegen Abnahme bei Zusatz von Alkohol oder Glycerin.

Tabelle I.
Dielektrizitätskonstanten der Lösungsmittel[8].

Lösungsmittel	Dielektrizitätskonstante	Lösungsmittel	Dielektrizitätskonstante
Wasser	80	Chloroform	5
Glycerin	56	Äther	4
Nitrobenzol	37	Xylol	2,4
Alkohol	25	Benzol	2.3
Aceton	22	Tetrachlorkohlenstoff	2,0

Zu vorliegenden Versuchen wurden die in Tabelle I zusammengestellten Lösungsmittel angewandt. Da man bei gewöhnlicher Temperatur eine 5%ige wässerige Phenollösung leicht herstellen kann, wurde diese Konzentration für die Versuche mit Milzbrandsporen gewählt. Bei Staphylococcus aureus, dem zweiten Testobjekt, wurden 1%ige Lösungen verwandt. Daß zwischen Phenol und dem jeweiligen Lösungsmittel nur physikalische Lösungsvorgänge und keine chemischen

[1] *Koch*, Mitt. K. G. A. **1**, 1881.
[2] *Paul* und *Krönig*, Zeitschr. f. Hyg. **25**, 1, 1897.
[3] *Minervi*, ebendaselbst **29**, 117, 1898.
[4] *Laplace*, Deutsch. med. Wochenschr. 1888, S. 121.
[5] *Kuroda*, diese Zeitschr. **169**, 281, 1926.
[6] *Heider*, Arch. f. Hyg. **15**, 359, 1892.
[7] *Frei* und *Kruppski*, Intern. Zeitschr. f. phys.-chem. Biol. **2**, 118, 1915.
[8] *Landoldt-Börnstein*, Phys.-Chem., Tab. 1923.

Umsetzungen eine Rolle spielen, wurde auf zwei Arten gezeigt. Bei den niedrig siedenden Lösungsmitteln kristallisiert das Phenol beim Verdunsten bei Zimmertemperatur in Nadeln aus und konnte nach Trocknung über konzentrierter Schwefelsäure durch Wägung quantitativ wiedergefunden werden. Aus allen Lösungen konnte durch mehrmaliges Ausschütteln mit Wasser ein großer Teil des Phenols wieder entfernt werden. Aus der wässerigen Lösung wurde es dann durch Bromwasser gefällt. Das entstandene Tribromphenol zeigte nach Reinigung und Trocknung den Schmelzpunkt von 92^0 (*Beilstein* gibt für 2, 3, 5-Tribromphenol 91,5 bis 92,5^0 an), typische Löslichkeitsverhältnisse und gab in wässerig-alkoholischer Lösung mit Eisenchlorid einen typischen braunvioletten Niederschlag. Die direkte Fällung des Phenols aus Benzol, Äther, Chloroform usw. gelingt nicht, da das Tribromphenol sich in diesen Stoffen spielend löst. Man bekommt zunächst eine Trübung in der wässerigen Schicht, beim Schütteln tritt aber wieder Klärung ein und Übergang des Tribromphenols in die nichtwässerige Schicht.

Die Desinfektionsversuche wurden ausgeführt, indem eine Aufschwemmung der Bakterienkultur über Chlorkalk im Exsikkator an Glasperlen antrocknen gelassen wurde. Die infizierten Perlen kamen in die zu untersuchenden Lösungen. Als Kontrollen dienten Perlen, die in Wasser, wässeriger Phenollösung und reinem Lösungsmittel lagen. Nach beendeter Einwirkung wurden die Perlen kurz in absolutem Alkohol und sterilem Wasser abgespült und mit flüssigem Agar von 40^0 auf Petrischalen gebracht. Nach 24stündigem Wachstum im Brutschrank bei 37^0 wurde die Dichte der entstandenen Kolonien beobachtet.

Die Angaben über die Widerstandsfähigkeit von Milzbrandsporen gegen wässerige Phenollösungen schwanken sehr. *Schottelius*[1] untersuchte mehrere Stämme und fand eine Abtötungszeit bei Anwendung 5%iger Phenollösung zwischen 6 Stunden und 28 Tagen. *Hammer*[2] fand bei einem Stamm sogar eine Zeit von 45 Tagen. Zu vorliegenden Versuchen diente ein Stamm des hygienischen Instituts Berlin von mittlerer Resistenz. Einen Versuch über die Einwirkung der Lösung von 5% Phenol in den in Tabelle I aufgeführten Lösungsmitteln zeigt Tabelle II.

Man sieht, daß das Phenol unabhängig von der Dielektrizitätskonstante des Mediums in verschiedenem Maße antiseptisch wirkt. Das Benzol zeigt eine Abweichung, insofern es ohne Phenolzusatz stärker antiseptisch wirkt als ohne, eine Erscheinung, die *Joachimoglu* und *Klissiunis* (l. c.) bei der Lösung des Quecksilberbromids in Benzol ebenfalls schon beobachteten, ohne eine Erklärung geben zu können.

---

[1] *Schottelius*, Arch. f. Hyg. 82, 76, 1914.

[2] *Hammer*, ebendaselbst 14, 116, 1892.

Tabelle II. Einwirkung von 5%igen Phenollösungen auf Milzbrandsporen.

Lösung	Einwirkungsdauer in Stunden					
	0	1	2	5	24	72
Wasser	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Phenol in Wasser . .	++++	++++	++++	+++	++	+
Glycerin	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Phenol in Glycerin .	++++	++++	++++	+++	++	+
Nitrobenzol	++++	++++	++++	++++	++	++
Phenol in Nitrobenzol	++++	++++	++++	+++	+	+
Alkohol	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Phenol in Alkohol . .	++++	++++	++++	++++	++	++
Aceton	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Phenol in Aceton . .	++++	++++	++++	++++	++	++
Chloroform	++++	++++	++++	++++	+++	++
Phenol in Chloroform	++++	+++	++	++	+	+
Äther	++++	+++	++	++	++	++
Phenol in Äther . .	++++	+++	++	+	+	+
Xylol	++++	++++	++++	++++	+++	+++
Phenol in Xylol . . .	++++	++++	++++	++++	++	++
Benzol	++++	+++	++	+	+	—
Phenol in Benzol . .	++++	+++	++	++	+	+
Tetrachlorkohlenstoff	++++	++++	++++	++++	++++	+++
Phenol in Tetrachlorkohlenstoff	++++	++++	++++	++++	++	+

++++ = starkes Wachstum. — = Sterilität.

Tabelle III gibt einen Versuch wieder, in welchem die Resistenz des zur Anwendung kommenden Staphylokokkenstammes gegen wässerige Phenollösungen bestimmt wurde. Als geeignete Konzentration wurde für die folgenden Versuche 1% gewählt.

Tabelle III.

Einwirkung von wässerigen Phenollösungen auf Staphylococcus aureus.

Konzentration	Einwirkungsdauer in Stunden			
	1/2	1	2	3
1/2%ig	++++	++++	+++	++
1%ig	+++	++	+	—
2%ig	++	+	—	—
3%ig	—	—	—	—

Tabelle IV zeigt die Einwirkung 1%iger Phenollösungen auf Staphylococcus aureus. Auch hier zeigt sich überall eine antiseptische Wirkung. Auch das Benzol macht diesmal keine Ausnahme.

Tabelle V gibt die Versuchsergebnisse wieder, die man bei Einwirkung 2%iger Lösungen von p-Chlorphenol auf Milzbrandsporen

Tabelle IV.

Einwirkung von 1%igen Phenollösungen auf Staphylococcus aureus.

Lösung	Einwirkungsdauer in Minuten									
	0	5	10	20	30	60	90	120	240	360
Wasser	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Phenol in Wasser	++++	++++	++++	++++	+++	++	++	+	—	—
Glycerin	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Phenol in Glycerin	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—
Nitrobenzol	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—
Phenol in Nitrobenzol	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—
Alkohol	+++	+++	+++	++	++	+	+	—	—	—
Phenol in Alkohol	+++	++	++	++	+	—	—	—	—	—
Aceton	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—	—
Phenol in Aceton	++++	++++	++++	++++	+++	+	—	—	—	—
Chloroform	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—	—
Phenol in Chloroform	+++	++	—	—	—	—	—	—	—	—
Äther	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—	—	—
Phenol in Äther	++++	++++	+++	++	+	—	—	—	—	—
Xylol	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	++	+	—
Phenol in Xylol	++++	++++	+++	++	+	—	—	—	—	—
Benzol	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—
Phenol in Benzol	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—
Tetrachlorkohlenstoff	++++	+++	+++	+++	++	++	+	+	—	—
Phenol in Tetrachlorkohlenstoff	++++	+++	++	+	—	—	—	—	—	—

erhält. 2 % ist die Konzentration, die man bei wässerigen Chlorphenollösungen gut herstellen kann, und sie wurde aus diesem Grunde zu den Versuchen gewählt.

Tabelle V.

Einwirkung von p-Chlorphenol in 2 %igen Lösungen auf Milzbrandsporen.

Lösung	Einwirkungszeit in Stunden			
	6	24	48	72
Wasser	++++	++++	++++	++++
Chlorphenol in Wasser	+++	++	+	—
Glycerin	++++	++++	++++	++++
Chlorphenol in Glycerin	+++	++	+	+
Nitrobenzol	++++	+++	+++	++
Chlorphenol in Nitrobenzol	+++	+	+	—
Alkohol	++++	+++	++	++
Chlorphenol in Alkohol	++++	+++	++	++
Aceton	++++	++	+	+
Chlorphenol in Aceton	++++	++	+	+
Chloroform	++++	+++	++	++
Chlorphenol in Chloroform	++++	+++	++	++
Äther	++++	+++	+++	++
Chlorphenol in Äther	++++	+++	+++	++
Xylol	++++	+++	++	++
Chlorphenol in Xylol	++++	+++	++	++
Benzol	+++	+	—	—
Chlorphenol in Benzol	+++	+	—	—
Tetrachlorkohlenstoff	+++	++	+	—
Chlorphenol in Tetrachlorkohlenstoff	+++	++	+	—

Man findet eine starke antiseptische Wirkung bei Wasser, Glycerin und Nitrobenzol, dagegen keine bei den übrigen Lösungsmitteln, eine Tatsache, die mit der eingangs erwähnten Hypothese gut übereinstimmt. Bei dem etwa 6 mal stärker als Phenol dissoziierten Chlorphenol macht sich der Einfluß der Dielektrizitätskonstante bereits wieder geltend.

Zu einem Versuche mit Staphylokokken wurde zunächst wieder die Resistenz gegen wässerige Lösungen des p-Chlorphenols bestimmt (s. Tabelle VI).

Tabelle VI.

Einwirkung von wässerigen Lösungen von p-Chlorphenol auf Staphylococcus aureus.

Konzentration	Einwirkungsdauer in Minuten			
	5	10	20	30
0,25%ig	++++	+++	++	+
0,5%ig	+++	++	+	—
1%ig	++	—	—	—
2%ig	—	—	—	—

Tabelle VII.

Einwirkung von p-Chlorphenol in 0,5%igen Lösungen auf Staphylococcus aureus.

Lösungen	Einwirkungszeit in Minuten						
	0	5	10	20	30	60	120
Wasser	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Chlorphenol in Wasser	++++	+++	++	++	+	—	—
Glycerin	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Chlorphenol in Glycerin	++++	++++	++++	+++	++	+	—
Nitrobenzol	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++
Chlorphenol in Nitrobenzol	++++	++++	++++	+++	++	+	—
Alkohol	+++	++	++	+	—	—	—
Chlorphenol in Alkohol	+++	++	++	+	—	—	—
Aceton	++++	++++	++++	++++	+++	++	—
Chlorphenol in Aceton	++++	++++	++++	++++	+++	++	—
Chloroform	+++	++	++	++	+	—	—
Chlorphenol in Chloroform	+++	++	++	++	+	—	—
Äther	++++	++++	++++	+++	++	+	—
Chlorphenol in Äther	++++	++++	++++	+++	++	+	—
Xylol	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++
Chlorphenol in Xylol	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++
Benzol	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++
Chlorphenol in Benzol	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++
Tetrachlorkohlenstoff	++++	++++	++++	++	++	+	—
Chlorphenol in Tetrachlorkohlenstoff	++++	++++	++++	++	++	+	—

Für den Hauptversuch mit Staphylococcus aureus, den Tabelle VII wiedergibt, wurde eine Konzentration von 0,5% Chlorphenol gewählt.

Auch hier findet man die gleichen Verhältnisse wie bei dem Versuch mit Milzbrandsporen, d. h. eine antiseptische Wirkung in den Lösungsmitteln hoher Dielektrizitätskonstante.

In Tabelle VIII sind die Versuchsergebnisse der Arbeiten von *Joachimoglu* und *Hellenbrand*, von *Joachimoglu* und *Klissiunis* und der vorliegenden Arbeit zusammengestellt, um den Zusammenhang zwischen der antiseptischen Wirkung mit der Dissoziation des Desinfiziens bzw. der Dielektrizitätskonstante des Solvens zu zeigen.

Tabelle VIII.

Abhängigkeit der Desinfektionswirkung von der Dissoziation des Desinfiziens und von der Dielektrizitätskonstante des Solvens.

Lösungsmittel	D.	Desinfiziens			
		Sublimat	$HgBr_2$	Phenol	p-Chlorphenol
		Dissoziationskonstante			
		$k_1 = 2,8 . 10^{-7}$ $k_2 = 0,35 . 10^{-7}$ *	$k_1 = 5,0 . 10^{-9}$ $k_2 = 0,4 . 10^{-9}$ *	$[25^0, v = 32]$ $k = 1,3 . 10^{-10}$ †	$[25^0, v = 32]$ $k_1 = 7,7 . 10^{-10}$ $k_2 = 4,1 . 10^{-10}$ †
Wasser	80	+	+	+	+
Glycerin	56	+	+	+	+
Nitrobenzol . . .	37	+	+	+	+
Alkohol	25	—		+	—
Aceton	22			+	—
Chloroform . . .	5	—	+	+	—
Äther	4	—	—	+	—
Xylol	2,4			+	—
Benzol	2,3	—	—	+	—
CCl_4	2,0			+	—

+ = Desinfektionswirkung, — = keine Desinfektionswirkung.

Zwischen Phenol und Parachlorphenol ist also ein Unterschied vorhanden, und zwar derart, daß das relativ stark dissoziierte Parachlorphenol in Lösungsmitteln niederer Dielektrizitätskonstante keine antiseptische Wirkung zeigt, während bei der Carbolsäure ein Einfluß der Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels nicht festzustellen ist. Zur Erklärung dieses Verhaltens die Lipoidlöslichkeit heranzuziehen, wäre nicht richtig, denn beide Stoffe, Carbolsäure und Parachlorphenol, sind stark lipoidlöslich.

---

* *Gmelin, Kraut, Friedheim,* Anorg. Chem. **5**, 2.
† *Landolt-Börnstein,* Phys.-chem. Tab., 1923.



Zusammenfassung.

1. Es wurde die antiseptische Wirkung des Phenols auf Milzbrandsporen und Staphylokokken in Lösungsmitteln verschiedener Dielektrizitätskonstante untersucht und kein Zusammenhang zwischen dieser und der antiseptischen Wirkung gefunden.

2. In gleicher Weise wurde die Wirkung des p-Chlorphenols untersucht und hier eine antiseptische Wirkung nur in Lösungsmitteln hoher Dielektrizitätskonstante gefunden.

3. Die zweite Tatsache wurde in Analogie zu den Beobachtungen bei Sublimat und Quecksilberbromid mit der stärkeren Dissoziation des p-Chlorphenols gegenüber dem Phenol in Beziehung gebracht.

4. Die Hypothese, daß die antiseptische Wirkung dissoziierter Stoffe von dem Grad ihrer Dissoziation und mithin von der Dielektrizitätskonstante des Mediums abhängt, erhält durch vorstehende Versuche eine neue Stütze.

Die Verwirklichung der phytochemischen Reduktionen durch Bakterien.

Von

Carl Neuberg und **Ernst Simon.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Als *phytochemische Reduktion* haben wir den Vorgang bezeichnet[1], bei dem Carbonyl-verbindungen (Aldehyde, Oxyaldehyde, Ketone, Oxyketone, Diketone, Chinone), Stickstoff-Sauerstoff-verbindungen (Nitro-, Nitroso-, Oximino-derivate), ferner Thioaldehyde, Disulfide biochemisch reduziert werden. Bei diesem Prozeß entstehen primäre oder sekundäre Alkohole und Hydrochinone bzw. Amine, Mercaptane und dergleichen. Diese phytochemischen Reduktionen sind bisher nur mittels Hefen bewerkstelligt worden, und zwar sowohl mit lebenden Hefen als durch Hefenmazerationssäfte. Nach unseren Feststellungen wird der für die Reduktion erforderliche Wasserstoff am leichtesten disponibel, wenn gleichzeitig eine Kohlenhydrat-zerlegung, eine Desmolyse, abläuft. Im Prinzip handelt es sich dabei um die Konkurrenz des zugesetzten reduzierbaren Stoffes mit einem normalen Wasserstoffakzeptor, bei der alkoholischen Zuckerspaltung um den Wettbewerb mit Acetaldehyd. Dementsprechend konnten in manchen Fällen als ein Äquivalent für die stattgehabte phytochemische Reduktion wesentliche Mengen Acetaldehyd bzw. Produkte seiner sekundären Umwandlung in den betreffenden Ansätzen mit phytochemisch reduzierten Substanzen nachgewiesen werden.

Ersichtlicherweise ist die Erscheinung der phytochemischen Reduktion von allgemeinerer Bedeutung; denn sie offenbart, wie durch einen desmolytischen Vorgang aktiver Wasserstoff für die verschiedensten lebenswichtigen Reduktionsprozesse bereitgestellt werden kann.

Es schien nun von Wichtigkeit, zu untersuchen, ob auch bei anderen Zellarten als bei Hefen die Fähigkeit zur Leistung phytochemischer Reduktionen nachgewiesen werden kann. Wir prüften zunächst das

[1] *C. Neuberg* und *E. Welde*, diese Zeitschr. **60**, 472, 1914.

Bacterium coli und das Bacterium lactis aerogenes. Diese Erreger liefern bekanntlich als ein gasförmiges Stoffwechselprodukt elementaren Wasserstoff; da man anzunehmen hat, daß dieser zunächst als atomarer Wasserstoff gebildet wird, darf man von ihm sogar die Auslösung besonderer Reduktionseffekte erwarten. *Aubel* und *Genevois*[1] meinen, daß dieser im biologischen Geschehen entwickelte Wasserstoff keine Reduktionswirkungen gegenüber den normalen Stoffwechselprodukten entfalte.

Unsere Versuche, bei denen wir einer durch die Bakterien in Gärung versetzten Lösung von Traubenzucker reduzierbare Substrate hinzufügten, ergaben deren phytochemische Umwandlung: p-Xylochinon wurde in praktisch quantitativer Ausbeute zum p-Xylohydrochinon reduziert, Valeraldehyd in einer Ausbeute von 73% zu Amylalkohol hydriert. Natriumthiosulfat lieferte Schwefelwasserstoff; aber zu unserer Überraschung verlief diese Reduktion nur zu dem geringen Betrage von 1 bis 2%.!

Schon seit langem ist bekannt, daß Farbstoffe, wie Thionin, Methylenblau usw., durch Bakterien entfärbt werden können. Der Mechanismus dieses Prozesses ist aber deshalb nicht einfach zu durchschauen, weil sehr viele natürlich vorkommende Verbindungen, wie beispielsweise Aminosäuren[2] und am-Formen des Zuckers[3], bei neutraler Reaktion Entfärbungen des Methylenblaus bewirken, die mit Stoffwechselprozessen nichts zu tun haben. Auch die Reduktion des Methylenblaus durch das System Acetaldehyd + Phosphat + Glykokoll ist nicht an die Beteiligung lebender Zellen oder Fermente geknüpft[4]. Ganz anders liegen die Verhältnisse für die von uns gewählten Stoffe. Wir zeigen, daß sie von den Bakterienleibern unter sonst gleichen Bedingungen nicht angegriffen werden.

Die quantitative Umwandlung des p-Xylochinons lehrt ferner, daß die Reduktion tatsächlich eine „wahre" Hydrierung ist; ein Vorgang nach dem Schema der Dismutation ist zwischen zwei Chinon-molekülen nicht möglich. Auch die Ausbeuten an Amylalkohol bei Verwendung des Valeraldehyds, die über eine 50%ige Reduktion des Aldehyds hinausgehen, führen zu dem gleichen Ergebnis. Diese Tatsache verdient Beachtung, weil festgestelltermaßen das Bacterium coli stark dismutative Eigenschaften[5] zu entfalten vermag.

---

[1] *E. Aubel* und *L. Genevois*, C. r. **184**, 1676, 1927.
[2] *F. Hasse*, diese Zeitschr. **98**, 159, 1919.
[3] *H. J. Hamburger*, ebendaselbst **128**, 185, 1922.
[4] *H. Haehn* und *A. Pülz*, Chemie d. Zelle u. Gewebe **12**, 65, 1925.
[5] *C. Neuberg* und *G. Gorr*, diese Zeitschr. **162**, 490, 1925; *C. Neuberg* und *F. Windisch*, ebendaselbst **166**, 454, 1925.

Experimenteller Teil.

Um die Fähigkeit zur Leistung der phytochemischen Reduktion an Bakterien zu prüfen, muß man sich der Mühe unterziehen, Massenzüchtungen vorzunehmen, da durch die Giftwirkung der zugesetzten Substrate die in dünner Aussaat angewandten Mikroorganismen leicht abgetötet werden.

Zu den Versuchen benutzten wir folgende Nährlösung:

Pepton *Witte* 5,0 g,
Magnesiumchlorid 0,5 g,
Kaliumchlorid 0,1 g,
Traubenzucker 50,0 g,
Leitungswasser zu 1000 ccm.

Die Coli-bakterien waren auf einem Gemisch gleicher Teile von Bierwürze- und Fleischextrakt-Agar gezüchtet. Das Gewicht der auf der Zentrifuge in ausgekochten Metallbechern abgeschleuderten und mit sterilem Leitungswasser gut gewaschenen Bakterien betrug in den einzelnen Versuchen 12 bis 15 g. Diese Bakterienmenge wurde in der dreimal sterilisierten Nährlösung suspendiert, die zwecks Abstumpfung sich entwickelnder Säuren mit 30 g keimfreien Calciumcarbonats versetzt war. Das Gemenge befand sich in einem 3-Liter-Jenaer Kolben unter Quecksilberverschluß. Bei der erheblichen Bakterienaussaat setzte bereits nach kurzer Zeit eine kräftige Gärung ein.

1. Versuch mit p-Xylochinon.

Nachdem das Bakterien-Nährstoff-gemisch 12 Stunden bei 37° belassen war, wurde eine Lösung von 2,0 g p-Xylochinon in 30 ccm absolutem Alkohol mittels eines Tropftrichters anteilweise hinzugegeben. Beim Hinzufügen wurde darauf geachtet, daß die Gärung nicht in Stillstand geriet. Die restlichen Anteile ließen wir erst nach 20 bzw. 36 Stunden zufließen. Nach 5tägiger Aufbewahrung im Brutschrank war die Gärung noch nicht vollständig zu Ende gekommen, der Chinongeruch war jedoch verschwunden.

Die Aufarbeitung erfolgte in ähnlicher Weise, wie wir sie früher für die phytochemische Reduktion dieses Körpers durch Hefe[1] beschrieben haben. Zu diesem Zweck wurde das Gemisch abzentrifugiert. Der Bakterienrückstand wurde der Wasserdampfdestillation unterworfen, wobei keine Spur von Chinon mehr überging. Die gleiche Prozedur mit einem aliquoten Teil des Zentrifugates zeigte ebenfalls an, daß die Reduktion zum Hydrochinon vollständig war.

[1] *C. Neuberg* und *E. Simon*, diese Zeitschr. 171, 256, 1926.



Die Hauptmenge des Zentrifugates wurde mehrmals ausgeäthert und die ätherische Lösung über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abdampfen des Äthers wurde der Rückstand in eine Kristallisierschale übergeführt, wobei das *p-Xylohydrochinon* direkt auskristallisierte. Die Ausbeute der im Exsikkator über Phosphorpentoxyd getrockneten Substanz betrug, auf den Gesamtansatz berechnet, 1,835 g. Nach dem Umkristallisieren aus Wasser unter Zusatz von etwas Tierkohle wurde die Verbindung in rein weißen Kristallen von Schmelzpunkt 212° erhalten, der dem p-Xylohydrochinon zukommt.

Kontrolle.

Zur Kontrolle wurde das oben erwähnte Gemenge von Bakterien und zuckerhaltiger Nährlösung 1 Stunde auf dem Baboblech gekocht und nach dem Abkühlen mit 2,0 g p-Xylochinon in 30 ccm absolutem Alkohol versetzt. Die Aufarbeitung erfolgte gleichzeitig mit dem Hauptversuch in folgender Weise: Der Ansatz wurde zentrifugiert, der Rückstand mit Wasserdampf behandelt und die Spur übergegangenen, im Bakterienschlamm absorbiert gewesenen Chinons zum Zentrifugat hinzugefügt. Dieses wurde mehrmals ausgeäthert; die rein gelbe ätherische Lösung, die sich schon durch ihre Eigenfärbung von der des Hauptversuchs unterschied, wurde über Natriumsulfat getrocknet und der nach dem Verjagen des Äthers erhaltene Rückstand in eine Kristallisierschale gebracht. Die Menge der getrockneten, den typischen Chinongeruch aufweisenden Kristalle, betrug 1,813 g. Nach dem Umkristallisieren aus heißem Wasser mit etwas Tierkohle lag der Schmelzpunkt bei 123°.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Reduktion des p-Xylochinons zum p-Xylohydrochinon kein von den Ingredienzien auf rein chemischem Wege herbeigeführter Vorgang ist.

2. Versuche mit Isovaleraldehyd.

In drei Kolben, die eine Suspension der Coli-bakterien in der oben erwähnten Nährlösung enthielten, wurde eine Lösung von je 2 g (2,5 ccm) „Isovaleraldehyd" in 7,5 ccm absolutem Alkohol langsam eingelassen. Die Zugabe erfolgte tropfenweise nach 15 und 45 Stunden. Falls die Gärung nach einiger Zeit zum Stillstand kam, wurden 20 g Zucker in 150 ccm Wasser unter sterilen Bedingungen zugesetzt. Nach 18 Tagen wurde die Aufarbeitung vorgenommen. Die Ansätze wurden mit Wasserdampf destilliert und in der üblichen Weise[1] anreichernd destilliert. Zur Entfernung etwa noch vorhandenen Valeraldehyds wurde die auf

[1] *C. Neuberg* und *E. Simon*, diese Zeitschr. 174, 452; 179, 443, 1926.



70 ccm eingeengte Lösung mit festem Natriumbisulfit gesättigt. Die Flüssigkeit wurde dann fünfmal ausgeäthert und die ätherische Lösung über geglühtem Natriumsulfat getrocknet. Nach Verdampfen des Äthers am Birektifikator wurde der Rückstand fraktioniert. Bei 80° ging eine hauptsächlich Äthylalkohol enthaltende Fraktion über. Dieser Anteil wurde nochmals über Bariumoxyd scharf getrocknet und der Weingeist am Birektifikator abgetrieben. Der mit wasserfreiem Äther herausgespülte Rückstand wurde erneut über Natriumsulfat getrocknet. Bei der Destillation wurden 1,8 ccm einer bei 127 bis 128° siedenden, stark nach Amylalkohol riechenden Fraktion erhalten.

Der überhalb 80° siedende Teil des ätherischen Auszuges besaß einen esterartigen Geruch. Dieser Anteil, der jedenfalls Ester enthielt, wurde daher 2 Stunden am Rückflußkühler mit 25 %iger Natronlauge im siedenden Kochsalzbade verseift; der Geruch nach Amylalkohol war nunmehr unverkennbar. Nach der Wasserdampfdestillation wurde das Destillat angereichert, mit den zuvor erhaltenen 1,8 ccm vereinigt und in einem fein graduierten Meßgefäß mit Kaliumcarbonat ausgesalzen. Es schieden sich 5,6 ccm Amylalkohol ab, der durch den Siedepunkt charakterisiert wurde; er wies optische Aktivität auf, da das Ausgangsmaterial, der „Isovaleraldehyd", etwas aktives Isomeres enthalten hatte. Die Menge entspricht 4,48 g *Amylalkohol* oder 73 %. Da die nach der Dismutation theoretisch mögliche Ausbeute an Amylalkohol 3 g ausmacht, so ist erwiesen, daß der große Mehrertrag an Amylalkohol auf phytochemische Reduktion zurückzuführen ist.

3. Versuch mit Natriumthiosulfat.

Zu diesem Versuch wurde das Bacterium lactis aerogenes angewendet, von dem die erforderliche große Menge ebenso gezüchtet war. Die Anordnung entsprach der eben geschilderten und ähnelte im übrigen der von *Neuberg* und *Welde*[1] bei Hefeversuchen benutzten. Nach dem Einsetzen kräftiger Gärung wurden 5 g $Na_2S_2O_3 + 5\,H_2O$ in 100 ccm H_2O der Bakteriensuspension zugesetzt. Als Vorlagen dienten drei Gaswaschflaschen, die 5 g $AgNO_3$ in 150 ccm H_2O enthielten. Während des Versuches wurde mehrmals Kohlensäure durch das System geleitet. Nach 3 Tagen wurde das in der ersten Vorlage abgeschiedene Schwefelsilber abfiltriert, mit Wasser und Alkohol gewaschen und getrocknet. Erhalten wurden 0,0797 g Ag_2S, in einem zweiten Versuch 0,1760 g Ag_2S. Diese Mengen entsprechen einer Umwandlung von 1 bzw. 2 % des zugesetzten Thiosulfats in Schwefelwasserstoff.

[1] *C. Neuberg* und *E. Welde*, diese Zeitschr. **67**, 111, 1914.

Kontrollen.

1. Die in der Nährlösung suspendierten Bakterien wurden während 1 Stunde auf dem Baboblech gekocht. Nach dem Erkalten erfolgte Zusatz von 5 g Thiosulfat. Bei Abbruch des Versuches war in den Vorlagen keine Spur von Schwefelsilber festzustellen.

2. Ein gleicher Ansatz mit Bakterien, jedoch ohne Beifügung von Natriumthiosulfat, ergab ebenfalls keine Bildung von Schwefelsilber in den Vorlagen.

Die im Hauptversuch beobachtete Bildung von Schwefelwasserstoff ist somit, wenn auch der Betrag gering ist, doch als biochemischer Prozeß anzusehen.

Über die enzymatische Abspaltung von Methylalkohol aus Pektin durch ein Ferment des Tabaks.

Von

Carl Neuberg und **Maria Kobel.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Von den Substanzen, die durch Hydrolyse Methylalkohol abspalten können, kommen drei Gruppen im Tabak vor: Methylalkohol-ester, Methoxyl-äther und N-Methyl-verbindungen.

Leicht zerlegbar sind von den genannten Verbindungen die Methylester. Wir haben vor Jahresfrist gezeigt[1], daß estermäßig gebundener Methylalkohol im Tabakblatt vorhanden ist, und zwar in Gestalt einer bis dahin nicht beachteten Verbindung, des Tabakpektins. Diese Form des gebundenen Methylalkohols spielt bei der Überführung der gepflückten Tabakblätter in die rauchfähigen Produkte eine Rolle. Wir haben nämlich gefunden, daß durch den als *Fermentation* bezeichneten Prozeß der Tabak-zubereitung der ursprünglich etwa 10 $^0/_{00}$ von der Trockensubstanz betragende Gehalt an esterförmigem Methoxyl bei der Vergärung abnimmt. Die fertigen Zigarrentabake enthalten etwa nur den zehnten Teil, d. h. 1 $^0/_{00}$, während die anders behandelten Zigarettentabake einen etwa 5- bis 7mal so hohen Gehalt an Methylalkohol der gleichen Bindungsform aufweisen, nämlich 5 bis 7 $^0/_{00}$. Die Pfeifentabak-sorten nehmen je nach ihrer Mischung eine mittlere Stellung ein.

Das Interesse für diesen Gehalt an locker gebundenem Methylalkohol stieg durch die Beobachtung von *Neuberg* und *Ottenstein*[2], daß beim *Rauchakt* der im Zigarren-, Zigaretten- und Pfeifentabak verbliebene Methylalkohol nur etwa zur Hälfte verbrennt, während der andere Teil mit dem Tabakrauch entweicht und in der Mundhöhle des Rauchers zurückgehalten wird, weil er sich im Speichel sofort auflöst[3].

Wir haben früher mitgeteilt, daß beim Stehen eines Breies frischer Tabakblätter Äthylalkohol und Acetaldehyd auftreten, die als Ver-

---

[1] *C. Neuberg* und *M. Kobel*, Naturwissensch. **14**, 1182, 1926; diese Zeitschr. **179**, 459, 1926.

[2] *C. Neuberg* und *B. Ottenstein*, diese Zeitschr. 188, 217, 1927.

[3] Die neuerdings auftauchende Behauptung, daß dem Nicotin keine Schuld an der Giftwirkung des Tabaks beizumessen sei, findet sich in keiner Veröffentlichung des hiesigen Instituts.

gärungsprodukte des Zuckers aufzufassen sind. Wir haben auch schon damals Methylalkohol neben Weingeist nachgewiesen, ohne mit Bestimmtheit seinen Bildungsmechanismus angeben zu können.

Eine genauere Verfolgung dieses eigentümlichen Vorkommens verhältnismäßig großer Mengen freien Methylalkohols in Mazeraten der Tabakblätter hat nun zu folgenden Feststellungen geführt.

Bei Verarbeitung frisch gepflückter Tabakblätter unter Bedingungen, die eine sofortige Unterbrechung der Enzymtätigkeit verbürgen, findet man lediglich minimale Spuren scheinbar präformierten Holzgeistes. Sind die Blätter vor Inaktivierung der Enzyme auch nur gemahlen, so genügt diese Zeit, um wesentliche Mengen Methylalkohol in Freiheit zu setzen. Leitet man eine richtige *Autolyse* ein, so werden nach den bisher vorliegenden Feststellungen 60% des locker gebundenen Holzgeistes frei. Wir müssen annehmen, daß die Muttersubstanz dieses leicht abspaltbaren Methylalkohols ein pektinähnlicher Bestandteil des Tabakblattes ist. Die genauen Angaben über die Autolyse sollen später folgen, und sie werden eine Ergänzung erfahren müssen durch Isolierung eines definierten Tabak-pektins, über dessen Existenz aber schon heute kaum ein Zweifel obwalten kann.

Ersichtlich liegen die Verhältnisse so, daß ein im Tabakblatt anwesendes Enzym, Pektase, wie wir schon früher anzunehmen gezwungen waren, auf das Tabakpektin verseifend wirkt und Methylalkohol in Freiheit setzt. Wir zeigen im folgenden, daß tatsächlich ein solches Ferment im Tabak vorkommt, und zwar ist es von außerordentlicher Wirkungsstärke. Bevor wir mit reinem Tabakpektin arbeiten können, haben wir als Substrat ein anderes definiertes Pektin benutzt, und zwar das aus dem Albedo der Citronenschale bereitete. Dieses kann man nach einer Vorschrift von *R. Sucharipa*[1] bequem gewinnen.

Den fermenthaltigen Saft der Tabakblätter bereitet man, indem man den frischen Blätterbrei auspreßt und den Saft mit Chloroform zur Klärung 24 Stunden stehen läßt. Man kann ihn nach Filtration direkt verwenden; man kann aber auch aus diesem Saft durch Fällung mit Alkohol das Ferment in festem Zustande ausfällen und nach Wiederauflösung in etwas reinerer Form benutzen. Für die von uns verfolgten Zwecke der Methylalkohol-abspaltung ist diese Reinigung jedoch nicht nötig.

Das Tabakferment wirkt auf Citronenpektin koagulierend und ist demnach als Pektase zu bezeichnen. Die Koagulation vollzieht sich mit außerordentlicher Schnelligkeit. Die besten bisher beobachteten

[1] *R. Sucharipa*, Die Pektinstoffe. Braunschweig 1925.

Pektasen sind die der Kartoffel- und Kleeblätter[1]. Nach Angaben von *Bertrand* und *Mallèvre* bringt der aus diesen Materialien gewonnene Fermentsaft das gleiche Volumen einer 2 %igen Pektinlösung in weniger als einer Minute zur Gerinnung. Wir haben zum Vergleich mit unserem Tabakferment einen Auszug aus Kartoffelblättern hergestellt und konstatiert, daß seine Wirksamkeit in bezug auf die Koagulation von Citronenpektin gleich ist. Die beiden Enzyme verschiedener Herkunft wirkten auf die 0,4 %ige Lösung des Citronenpektins in 45 Sekunden gelatinierend. Diese Gerinnung tritt bei der natürlichen Wasserstoffionenkonzentration des Saftes von p_H = etwa 5,5 ein. Nach Herstellung eines ganz neutralen Milieus bleibt die Koagulationszeit unverändert. Nach der sauren oder alkalischen Seite findet eine Hemmung statt. Wir zitieren in diesem Zusammenhange die Beobachtung von *v. Euler* und *Svanberg*[2], nach der für die Gerinnung von Johannisbeersaft, der Pektin wie Pektase enthält, ein p_H von 4,3 optimal ist. Hier erfolgt die Koagulation schnellstens in einer halben Stunde, meistens nach sehr viel längerer Zeit, während, wie gesagt, unser Tabakferment schon innerhalb 45 Sekunden ein Koagulum erzeugt (s. S. 237 u. 238.) *Bertrand* und *Mallèvre*[3], denen man wichtige Beobachtungen über die Pektase verdankt, haben einen Zusatz löslicher Erdalkalisalze empfohlen. Es scheint auch beim Tabakferment die Hinzufügung von Calcium- und Magnesiumchlorid die Abscheidung eines dickeren Koagulums aus sehr verdünnten (0,2 %igen) Pektin-lösungen zu befördern, wenn man durch gleichzeitige Beigabe von Calciumcarbonat ein neutrales Milieu erhält. Nun hat *Th. von Fellenberg*[4] bereits darauf hingewiesen, daß sowohl durch die Wirkung der Pektase als der Pektinase, d h. der Pektin koagulierenden und weiter abbauenden Fermente, Holzgeist in Freiheit gesetzt wird; wenigstens hat er in qualitativen Versuchen gezeigt, daß mit der Pektasewirkung eine Abspaltung von Holzgeist einhergeht.

Wir finden, daß der Koagulationsvorgang, der bei Einwirkung von Tabakferment auf Citronenpektin sich vollzieht, von einer fast totalen Methylalkohol-abspaltung begleitet ist. 80 bis 90 % des im Pektin vorhandenen Methoxyls werden in weniger als einer Stunde frei. Nach dem Kochen wirkt das Tabakferment nicht mehr auf Pektin ein.

Somit kann ein tabakeigenes Ferment für die Abspaltung von Methylalkohol aus Pektin wohl verantwortlich gemacht werden. Wenn trotzdem beim Trocknen der ganzen Tabakblätter, wie wir früher gefunden haben, die Hauptmenge des Pektin-methoxyls erhalten bleibt

---

[1] *G. Bertrand* und *A. Mallèvre*, C. r. **121**, 726, 1895.
[2] *H. v. Euler* und *O. Svanberg*, diese Zeitschr. **100**, 271, 1919.
[3] *G. Bertrand* und *A. Mallèvre*, C. r. **119**, 1013, 1894.
[4] *Th. v. Fellenberg*, diese Zeitschr. **85**, 118, 1918.



und ein Teil selbst den Vergärungsprozeß überdauert, so liegt dies wahrscheinlich daran, daß bei der schnellen Wasserentziehung das Enzym nicht Zeit zur Entfaltung seiner Wirkungsfähigkeit findet; namentlich aber fehlt wohl bei der Trocknung unverletzter Blätter die innige Berührung von Ferment und Substrat.

I. Darstellung der Ausgangsmaterialien.

1. Pektin.

Das Citronenpektin wurde aus dem Albedo des Perikarps von Citronen gewonnen. Nach einer Vorschrift von *Sucharipa* (l. c.) wird die gelbe ölhaltige Außenschicht der Citronen gründlich entfernt, dann das Albedo abgeschält und in kleine Stücke zerhackt. 500 g dieses Ausgangsmaterials werden mit 2 Liter destilliertem lauwarmen Wasser übergossen und über Nacht stehengelassen. Am nächsten Tage wird durch ein Tuch filtriert und das Auszieher mit lauwarmem Wasser noch einmal wiederholt. Auf diese Weise wird das nur in geringer Menge vorhandene lösliche Pektin extrahiert[1]. Die Hauptmenge des Pektins bleibt als unlösliches Protopektin im Rückstande und wird erst durch Hydrolyse in die lösliche Form (Hydrato-pektin) übergeführt. Um das zu erreichen, wird der Rückstand des Kaltwasserauszuges mit 3 Liter siedendem destillierten Wasser übergossen und ½ Stunde gekocht. Nach Filtration durch ein Tuch wird die Auskochung in gleicher Weise noch 2mal wiederholt[2]. Die so erhaltenen Pektinlösungen werden im *Faust-Heim*schen Verdunstungskasten auf etwa ein Drittel bis ein Viertel eingeengt und mit dem vierfachen Volumen absoluten Alkohols gefällt; nach dem Absaugen wird an der Luft getrocknet. Ausbeute 19 g lufttrockenes Pektin.

2. Pektaselösungen.

2 kg frisch gepflückter entrippter Tabakblätter werden gemahlen und ausgepreßt. Man erhält so etwa 1 Liter Preßsaft, der mit 50 ccm Chloroform gut durchgeschüttelt und 24 Stunden in einer dunklen Flasche aufbewahrt wird. Beim Stehen scheidet sich ein dickes Koagulum ab, das durch Filtration leicht entfernt werden kann. Das klare Filtrat beträgt dann etwa 800 ccm; es enthält das Ferment Pektase in sehr wirksamer Form und wurde für die im folgenden beschriebenen Versuche meist direkt verwendet. Nur zu einigen Koagulationsversuchen wurde eine weitere Reinigung durch Fällung des Ferments mit Alkohol vorgenommen.

[1] Betr. der Chemie der Pektinkörper verweisen wir auf die Mitteilungen von *v. Fellenberg* (l. c.) und die von *F. Ehrlich* und Mitarbeitern, diese Zeitschr. **163**, 263; **169**, 13, 1926.

[2] Ein längeres Kochen ist möglichst zu vermeiden, da sonst ein weiterer Abbau des Pektins verbunden mit Methylalkoholabspaltung stattfindet.

Zu diesem Zweck werden 400 ccm des Saftes mit 800 ccm 90 %igen Alkohols versetzt. Der entstehende flockige Niederschlag wird durch Zentrifugieren abgetrennt und auf Ton getrocknet. Das so gewonnene Fermentpulver wird in 133 ccm destillierten Wassers (= ein Drittel des ursprünglich verwendeten Saftvolumens) eingetragen, ½ Stunde geschüttelt und nach Stehen über Nacht durch Zentrifugieren von unlöslichen Bestandteilen getrennt. So erhält man eine klare, etwas reinere wirksame Fermentlösung.

II. Nachweis der Pektase.

1. Koagulation von Citronenpektin.

Die Koagulationsversuche wurden mit frischen Fermentpräparaten aus je zwei verschiedenen Zigarrentabaken (Geudertheimer, Wongkong) und Zigarettentabaken (Peruschtitza, großblättrig, und Xanthi Owà, kleinblättrig) ausgeführt, und zwar wurden sowohl rohe als reine Fermentlösungen verwendet. Das p_H-Optimum der Fermentwirkung wurde durch Variation der Wasserstoffionen-konzentration ermittelt. Die zu diesem Zweck zugefügten Säure- bzw. Laugemengen sind aus den Tabellen ersichtlich. Die Citronenpektinlösung war 0,4 %ig.

Tabelle I.

Koagulation durch Saft von frischem „Geudertheimer“ Tabak.

Zusammensetzung des Saftes	p_H des Saftes	Angewandte ccm Saft	Angewandte ccm 0,4 %iger Citronenpektinlösung	Koagulationszeit Minuten
Saft ohne Zusatz . . .	5,49	1	1	1
10 ccm Saft + 0,5 ccm n HCl.	3,98	1	1	1¾
10 ccm Saft + 0,5 ccm 2n HCl	3,94.	1	1	1¾
10 ccm Saft + 0,5 ccm n NaOH	8,10	1	1	2¼

Tabelle II.

Koagulation durch gereinigte Fermentlösung von frischem „Geudertheimer“ Tabak.

Zusammensetzung der Fermentlösung	p_H der Fermentlösung	Angewandte ccm Fermentlösung	Angewandte ccm 0,4 %iger Citronenpektinlösung	Koagulationszeit Minuten
Fermentlösung ohne Zusatz	5,94	1	1	3
10 ccm Fermentlösung + 0,5 ccm n HCl. .	4,53	1	1	3½
10 ccm Fermentlösung + 0,5 ccm 2n HCl .	3,96	1	1	4
10 ccm Fermentlösung + 0,2 ccm n NaOH	9,06	1	1	8

Tabelle III.

Koagulation durch Saft von frischem „Wongkong"-Tabak.

Zusammensetzung des Saftes	p_H des Saftes	Angewandte ccm Saft	Angewandte ccm 0,4%iger Citronenpektinlösung	Koagulationszeit Minuten
Saft ohne Zusatz . . .	5,56	1	1	1
10 ccm Saft + 0,5 ccm n HCl.	4,42	1	1	2

Tabelle IV.

Koagulation durch gereinigte Fermentlösung von frischem „Wongkong"-Tabak.

Zusammensetzung der Fermentlösung	p_H der Fermentlösung	Angewandte ccm Fermentlösung	Angewandte ccm 0,4%iger Citronenpektinlösung	Koagulationszeit Minuten
Fermentlösung ohne Zusatz	6,07	1	1	3

Tabelle V.

Koagulation durch Saft von frischem „Peruschtitza"-Tabak.

Zusammensetzung des Saftes	p_H des Saftes	Angewandte ccm Saft	Angewandte ccm 0,4%iger Citronenpektinlösung	Koagulationszeit Minuten
Saft ohne Zusatz . . .	5,36	1	1	3/4
	5,36	1/2	1	1
10 ccm Saft + 0,5 ccm n HCl	4,46	1	1	1
	4,46	1/2	1	1 1/4
10 ccm Saft + 0,5 ccm 2n HCl	4,01	1	1	1 1/4
	4,01	1/2	1	1 3/4
10 ccm Saft + 0,5 ccm n NaOH	7,46	1	1	1 1/2
	7,46	1/2	1	2

Tabelle VI.

Koagulation durch gereinigte Fermentlösung von frischem „Peruschtitza"-Tabak.

Zusammensetzung der Fermentlösung	p_H der Fermentlösung	Angewandte ccm Fermentlösung	Angewandte ccm 0,4%iger Citronenpektinlösung	Koagulationszeit Minuten
Fermentlösung ohne Zusatz	5,56	1	1	1 1/2
10 ccm Fermentlösung + 0,5 ccm n HCl. .	4,45	1	1	2
10 ccm Fermentlösung + 0,5 ccm 2n HCl .	3,89	1	1	2 1/4
10 ccm Fermentlösung + 0,2 ccm n NaOH .	8,52	1	1	3
10 ccm Fermentlösung + 0,5 ccm n NaOH	10,60	1	1	25

Tabelle VII. Koagulation durch Saft von frischem „Xanthi Owà“-Tabak.

Zusammensetzung des Saftes	p_H des Saftes	Angewandte ccm Saft	Angewandte ccm 0,4%iger Citronenpektinlösung	Koagulationszeit in Minuten
Saft ohne Zusatz	5,56	1	1	3/4
	5,56	1/2	1	1
10 ccm Saft + 0,5 ccm n HCl	4,45	1	1	1
	4,45	1/2	1	1 1/2
10 ccm Saft + 0,5 ccm 2 n HCl	3,88	1	1	1 3/4
	3,88	1/2	1	2 3/4

Tabelle VIII. Koagulation durch gereinigte Fermentlösung von frischem „Xanthi Owà“-Tabak.

Zusammensetzung der Fermentlösung	p_H der Fermentlösung	Angewandte ccm Fermentlösung	Angewandte ccm 0,4%iger Citronenpektinlösung	Koagulationszeit Minuten
Fermentlösung ohne Zusatz	5,86	1	1	1 1/2

2. Abspaltung von Methylalkohol aus Citronenpektin.

Die durch die Pektase des Tabaksaftes verursachte Abspaltung des Methylalkohols aus Citronenpektin haben wir dadurch nachgewiesen, daß wir Saft (s. S. 235) aus frischem Wongkong-Tabak bei 37° auf eine 0,2 %ige Citronenpektinlösung einwirken ließen, die enzymatische Tätigkeit zu bestimmten Zeiten unterbrachen und den frei gewordenen Methylalkohol wie den esterartig gebundenen bestimmten. Zur Verhinderung des Bakterienwachstums wurden der Saft und die Pektinlösung mit Chloroform gesättigt. Die Inaktivierung der Fermente erfolgte durch kurzes Aufkochen (1 bis 2 Minuten) der Reaktionsgemische unter Zusatz von 0,5 g Calciumcarbonat am Rückflußkühler. Dann wurde sofort abgekühlt, der Kühler gut durchgespült und das Gemisch quantitativ in einen Claisenkolben übergeführt. Die gesamte Flüssigkeit wurde im Vakuum bei 30 bis 35° abdestilliert[1]. In üblicher Weise wurde dann das Destillat anreichernd konzentriert und der Methylalkohol kolorimetrisch nach *v. Fellenberg* (l. c.) bestimmt. Der nicht abgespaltene Pektin-Methylalkohol wurde in dem nach der Vakuumdestillation verbliebenen Rückstande durch Verseifung in Freiheit gesetzt und nach Abdestillation mit Wasserdampf und Anreicherung nach der gleichen Methode quantitativ ermittelt. Die Verseifung des Rückstandes geschah durch Zufügen von 60 ccm heißen Wassers, kurzes Erhitzen (2 bis 3 Minuten) im siedenden Wasserbade und Zusatz von 30 ccm 10 %iger

[1] Diese vorsichtige Art der Destillation erwies sich als nötig, da wir bei längerem Sieden unter gewöhnlichem Druck eine partielle Hydrolyse des Pektins unter Abspaltung von Methylalkohol feststellen konnten.

Natronlauge. Nach kräftigem Umschütteln blieb das Reaktionsgemisch etwa 12 Stunden gut verschlossen stehen. Dann wurden 15 ccm 20 vol.-%iger Schwefelsäure zugefügt und im Dampfstrom 200 ccm überdestilliert.

Tabelle IX.

Methylalkoholabspaltung aus 0,2 %iger Pektinlösung durch Saft aus frischem „Wongkong"-Tabak.

ccm 0,2%ige Citronenpektinlösung	ccm frischer Tabaksaft	Einwirkungszeit Stunden	Fermentativ abgespaltener Methylalkohol mg	Rest-Pektinmethylalkohol mg	Anmerkung
50	15	1	7,74	—	
50	15	6	7,13	—	
50	15	24	6,31	1,33	
50	25	1	6,60	—	
50	25	6	6,11	1,47	
50	25	24	5,26	1,47	
—	50	1	1,40	0,54	Zur Verdünnung wurden je 100 ccm Wasser zugesetzt
—	50	6	1,83	—	
—	50	24	1,88	0,53	

Ob die Abnahme an abgespaltenem Methylalkohol auf mechanischen Verlusten (es wurde in den ersten Versuchsreihen, Tabelle IX und X, in mit Korkstopfen verschlossenen Gefäßen gearbeitet) oder Wirkung eines anderen Fermentes, vielleicht einer Oxydase, beruht, muß noch näher untersucht werden.

Tabelle X.

Einwirkung von gekochtem Tabaksaft auf 0,2 %ige Pektinlösung.

ccm 0,2%ige Citronenpektinlösung	ccm gekochter Tabaksaft	Einwirkungszeit Stunden	Freier* Methylalkohol mg	Rest-Pektinmethylalkohol mg
50	15	1	0,37	10,25
50	15	6	0,36	10,30
50	15	24	0,70	10,30
50	25	1	0,90	10,35
50	25	6	0,76	10,32
50	25	24	0,64	10,35
—	50	sofort destilliert	1,40	0,56

* Das ist während der Saftbereitung aus Tabakpektin abgespaltener Methylalkohol.

Tabelle XI.

Gesamtmethylalkoholbestimmung nach Verseifung mit Natronlauge.

0,2%ige Citronenpektinlösung ccm	Frischer Tabaksaft ccm	Gesamtmethylalkohol nach Verseifung mg
50	—	9,27
50	—	9,43
—	50	2,42
—	50	2,28

Tabelle XII.

Methylalkoholabspaltung aus 0,2 %iger Pektinlösung durch Saft[1] aus frischem „Wongkong“-Tabak mit und ohne Zusatz von Calcium-Magnesiumchlorid und Calciumcarbonat.

0,2%ige Citronenpektinlösung ccm	Frischer Tabaksaft ccm	Zusatz	Einwirkungszeit Stunden	Fermentativ abgespaltener Methylalkohol mg	Rest-Pektinmethylalkohol mg
100	25	—	1	13,88	4,36
100	25	0,2 ccm 10%ige $CaCl_2$, $MgCl_2$-Lösung + 0,5 g $CaCO_3$	1	14,30	4,14
100	25	—	24	16,33	2,34
100	25	0,2 ccm 10%ige $CaCl_2$, $MgCl_2$-Lösung + 0,5 g $CaCO_3$	24	16,93	2,45
100	50	—	24	15,80	2,97

Tabelle XIII.

Gesamtmethylalkoholgehalt der für die Versuche der Tabellen XII verwendeten Ausgangsmaterialien.

0,2%ige Citronenpektinlösung ccm	Frischer Tabaksaft ccm	Gesamtmethylalkohol nach Verseifung mg
100	50	22,10
100	25	20,80
—	50	2,26
—	25	1,13

[1] Für die Versuche der Tabellen XII und XIII wurde eine andere Saftfertigung verwendet.

Einige neue Laboratoriumsapparate.

Von

Hans J. Fuchs.

(Aus dem Institut „August von Wassermann“, Berlin.)

(Eingegangen am 12. September 1927.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

1. Destillationsapparat zur Herstellung von reinstem, sterilem, destilliertem Wasser.

Der Apparat hat folgende Konstruktionseinzelheiten, die sowohl unbedingt zuverlässig sind als auch durch ihren verhältnismäßig geringen Anschaffungspreis und ihre sehr einfache Bedienung hervorragen:

Die gesamte Apparatur besteht aus Jenaer Geräteglas von *Schott* und *Genossen*. Dieses hat sich mir schon früher bei der von mir konstruierten Mikrokjeldahlapparatur[1] als unbedingt zuverlässig für Nichtabgabe von Alkali nach längerem einmaligen Auskochen erwiesen. Sämtliche an der Apparatur befindlichen Verbindungen sind luftdicht und beweglich, ohne daß Gummi oder andere organische Substanzen dabei verwendet wurden. Dadurch wird gleichzeitig die Qualität ebenso wie die Sterilität des destillierten Wassers und das Fernhalten der Kohlensäure der Luft gesichert. Der Kochkolben *K* — ein Zweiliter-Erlenmeyerkolben aus Geräteglas — trägt seitlich unten am Boden das Zulaufrohr *Z*. In dieses hängt das schräge Rohrende des Scheidetrichters, der zur automatischen Regelung des Wasserspiegels im Kochkolben mit Wasser gefüllt ist. Er trägt einen eingeschliffenen Stopfen an der Einfüllöffnung, einen eingeschliffenen Hahn unter der Auftreibung und faßt zwei Liter. An der Öffnung des Kochkolbens sind zwei umeinander liegende Rohre angeschmolzen, zwischen die das rohrförmige Ende der an dem einen Ende des Kugelkühlers *D* angeschmolzenen Hopkinskugel *H* zu liegen kommt. Durch Einfüllen von etwas Wasser

[1] *H. J. Fuchs*, diese Zeitschr. 176, 32, 1926.

(in der Abb. 1 gestrichelt gezeichnet) ist die gelenkige Verbindung dampf- und luftdicht verschlossen.

Die Hopkinskugel, die das Mitreißen von Wasserteilchen verhindert, setzt sich — wie erwähnt — in den Kugelkühler fort, der schräg nach unten zu der mit eingeschliffenem Heber *He* versehenen 5-Liter- oder 10-Liter-Flasche aus Geräteglas führt. Das Ende des aus dem

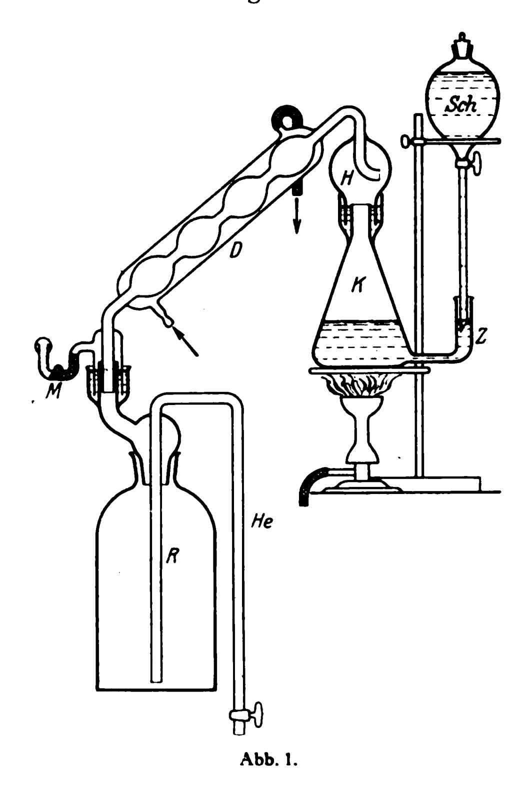


Abb. 1.

Kugelkühler heraustretenden Glasrohres trägt eine ähnliche Verschlußsicherung, wie sie an der Hopkinskugel beschrieben. Nur ist diese durch einen weiteren Rohrmantel nochmals gesichert. Dieser trägt nach außen ein U-förmiges Ansatzstück, in dem Chlorcalcium und Watte die zutretende Luft von Bakterien und Kohlensäure befreit. Das Rohr ist so angebracht, daß kein Wasserdampf hineinkommen kann. Das aus dem Kühler herausfließende destillierte Wasser fließt — wie aus der Abbildung ersichtlich — in die Sammelflasche, aus der es nach Belieben jederzeit mittels des Hebers entnommen werden kann.

Der volle Scheidetrichter füllt während der Destillation ohne Öffnen der Apparatur jederzeit Wasser nach; dieses erfolgt vollkommen

automatisch! Der am Stativ in einem offenen Ring hängende Scheidetrichter gibt sofort Wasser in die Kochflasche ab, wenn in dieser und damit auch in dem Zuleitungsrohr *Z* der Wasserspiegel so weit gesunken ist, daß das schräge Ende des Scheidetrichterrohres frei liegt. Dann steigt in dem Rohr Luft nach oben in den Scheidetrichter und läßt eine entsprechende Menge Wasser aus dem Scheidetrichter herausfließen. Sobald der Wasserspiegel das Rohrende wieder bedeckt, hört das Zufließen automatisch auf. Ist der Wasservorrat des Scheidetrichters erschöpft, so hängt man ihn vorsichtig durch leichtes Anheben aus dem Haltering aus, schließt den unteren Hahn, öffnet den oberen Stopfen und füllt ihn fast ganz mit frischem Wasser voll; schließt dann den oberen Stopfen, hängt den Trichter wieder ein in den Ring wie vorher und öffnet den unteren Hahn: damit ist ohne Unterbrechung der Destillation der Wasservorrat erneuert. Ebenso, wie man immer wieder Wasser ohne Störung der Destillation ergänzen kann, kann man auch jederzeit mittels des Hebers Wasser aus der Flasche *R* entnehmen. Dabei erhält man immer das am Boden der Flasche befindliche kühle Wasser während der Destillation.

Ist das System einmal sorgfältig ausgekocht und sterilisiert, so kann es dauernd im Gebrauch bleiben, ohne daß Verschmutzungen möglich sind. Das Wasser im Kochkolben wird am besten mit etwas reinster Phosphorsäure und reinstem Kaliumpermanganat versetzt. etwaiges Stoßen wird durch Zugabe eines Teelöffels von Talkum ein für allemal verhindert. Der mit starker Flamme direkt erhitzte Kochkolben hält — wie alle aus Geräteglas angefertigten Glasapparate — jahrelang, ohne zu entglasen. Die Menge der Destillation schwankt — je nach Stärke der Erhitzung — zwischen ½ und 2 Liter pro Stunde.

Elektrometrische Messungen vom p_H des destillierten Wassers ergaben 7,01 bis 6,99 bei Destillation mit Kaliumpermanganat, Phosphorsäure und Talkum.

Sterilitätsprüfungen nach wochenlangem Stehen der Apparatur ohne Erhitztwerden ließ keine bakteriellen Verunreinigungen feststellen.

2. Stalagmometer.

Das *Traube*sche Stalagmometer gibt mit Aqua dest. eine Tropfenzahl, die sich nur gering von der mit gesättigter Tributyrinlösung erhaltenen unterscheidet. Dabei spielt — wie Untersuchungen ergaben — die ausfließende Flüssigkeitsmenge nur eine geringe Rolle. Um so größer ist der vollkommen unberücksichtigte Fehler der Adhäsion bei der *Traube*schen Apparatur: An der verhältnismäßig sehr großen, plan geschliffenen Abtropffläche des Stalagmometers ist die Adhäsion der ausfließenden Flüssigkeit im Verhältnis zur Oberflächenspannung

des daran entstehenden Tropfens sehr groß. Er variiert natürlich bei verschiedenen Flüssigkeiten; der dabei entstehende große Fehler bleibt unberücksichtigt. Da diese Adhäsion nicht völlig auszuschalten ist, sollte sie wenigstens möglichst verkleinert werden. Dieses habe ich berücksichtigt und außerdem auf Einhaltung genauer Temperatur Wert gelegt. Infolgedessen gibt einerseits diese Konstruktion sehr genau übereinstimmende Werte bei Parallelbestimmungen, andererseits ist die Tropfenzahldifferenz zwischen z. B. Aqua dest. und gesättigter Tributyrinlösung mehr als viermal so groß, wie sie bei einem *Traube*schen Stalagmometer von gleichem Fassungsvermögen ist.

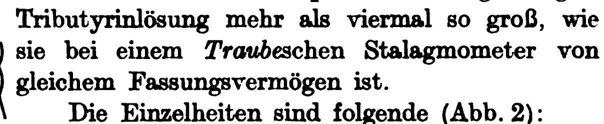
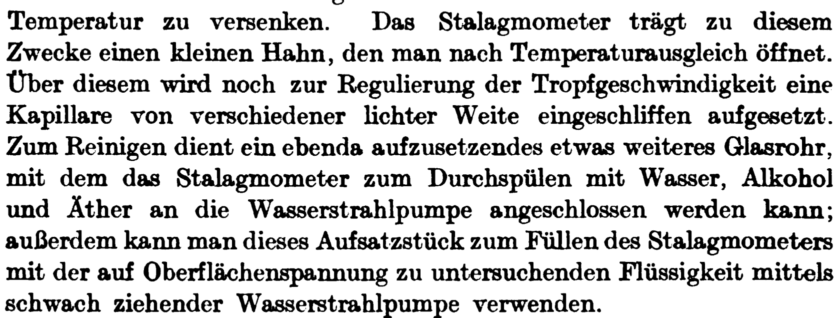


Abb. 2.

Die Einzelheiten sind folgende (Abb. 2):

Das Stalagmometer besteht aus einer Kapillare, die in der Mitte eine kugelförmige Erweiterung trägt. Oberhalb und unterhalb dieser Kugel ist die Kapillare in gleicher Weise wie das *Traube*sche Stalagmometer graduiert, um genaues Tropfenablesungsvermögen zu erreichen.

Das untere Ende der Kapillare ist konisch geschliffen: der Schliff *Sch* paßt gasdicht in den Gegenschliff des Sammelgefäßes *S*. Unterhalb des Schliffes endet die Kapillare ganz spitz ausgezogen glatt, um der austretenden Flüssigkeit möglichst geringe Adhäsionsfläche zu bieten. Die Tropfen sammeln sich dann in dem herzförmigen Sammelgefäß. Dieses dient dazu, das Stalagmometer gefüllt in ein Wasserbad von bestimmter Temperatur zu versenken. Das Stalagmometer trägt zu diesem Zwecke einen kleinen Hahn, den man nach Temperaturausgleich öffnet. Über diesem wird noch zur Regulierung der Tropfgeschwindigkeit eine Kapillare von verschiedener lichter Weite eingeschliffen aufgesetzt. Zum Reinigen dient ein ebenda aufzusetzendes etwas weiteres Glasrohr, mit dem das Stalagmometer zum Durchspülen mit Wasser, Alkohol und Äther an die Wasserstrahlpumpe angeschlossen werden kann; außerdem kann man dieses Aufsatzstück zum Füllen des Stalagmometers mit der auf Oberflächenspannung zu untersuchenden Flüssigkeit mittels schwach ziehender Wasserstrahlpumpe verwenden.



Zum Gebrauch setzt man auf das sorgfältig gereinigte Stalagmometer das weite, an den Schlauch der Wasserstrahlpumpe angeschlossene Ansaugstück oben auf, stellt die Wasserstrahlpumpe auf schwaches Saugen ein, öffnet den Hahn unterhalb des Aufsatzstückes vorsichtig und saugt die zu untersuchende Flüssigkeit langsam im Stalagmometer hoch, bis die obere Ringmarke überschritten ist,

schließt dann rasch den Hahn und trennt den Apparat von dem Aufsatzstück, das man während der Arbeit am Vakuumschlauch beläßt. Nach sorgfältigstem Trockenwischen des spitzen Stalagmometerendes mit reinem, weichem Tuch steckt man den Apparat in das Sammelgefäß und versenkt ihn dann in ein Wasserbad von gewünschter Temperatur. Während der 10 Minuten oder mehr Wartezeit setzt man auf das obere Ende die gewünschte Tropfgeschwindigkeitskapillare auf. Dann öffnet man den Hahn, beobachtet den Stand des Flüssigkeitsmeniskus beim Abfall des ersten Tropfens und zählt die weiteren Tropfen genau so wie beim *Traube*schen Apparat. Nach Beendigung hebt man die Apparatur aus dem Wasserbad, nimmt zuerst die Tropfgeschwindigkeitskapillare ab, die unbedingt vor Feuchtigkeit oder Schmutz behütet werden muß, trennt die Verbindung zwischen Sammelgefäß und Stalagmometer, setzt letzterem das am Vakuumschlauch befestigte weite Ansatzstück auf und saugt — wie bereits gesagt — reinigende Flüssigkeit durch.

Diese Konstruktion, die sich in vielen Versuchen durchaus bewährt hat[1], ermöglicht, recht geringe Unterschiede der Oberflächenspannung von Flüssigkeiten fehlerfrei festzustellen.

3. Apparat zur gleichmäßigen Gasdurchperlung mehrerer Flüssigkeiten in gleicher Menge und zu gleicher Zeit.

Um mehrere Flüssigkeiten gleichzeitig und gleichmäßig mit Gas zu durchperlen, wurden bisher komplizierte Instrumente verwendet. Da das entwickelte Gas das Bestreben hat, dort auszutreten, wo ihm der geringste Widerstand entgegensteht, ist es unmöglich, aus einer Gasquelle mehrere Flüssigkeiten enthaltende Gefäße gleichzeitig und gleichmäßig ohne zwangläufige Verteilung zu durchströmen. Das einfachste Prinzip der zwangmäßigen Verteilung, ein rotierender Hahn, wurde hier verwendet.

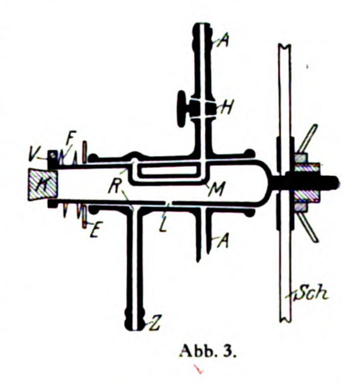


Abb. 3.

Der Außenmantel des gläsernen Verteilerhahnes (Abbildung 3) trägt ein Zuführungsrohr *Z*, das mit einem im Außenmantel befindlichen kreisförmigen Kanal *R* während der gesamten Umdrehung dauernd in Verbindung steht. Außerdem sind an dem Außenmantel in einer anderen gemeinsamen Ebene vier oder mehr Ableitungsrohre angeschmolzen, die bis auf zwei Stück sämtlich mit Hähnen *H* versehen sind.

[1] *v. Falkenhausen*, diese Zeitschr. 185, 336, 1927.

Das Innenstück des Verteilerhahnes ist nicht massiv, sondern hohl. Es trägt in sich zunächst ein zweimal rechtwinklig gebogenes Rohr *M*, das die beiden Ebenen von Zuleitungsrohr und Ableitungsrohren miteinander verbindet. Gegenüber diesem Rohr trägt es ein Loch *L*. An dem einen geschlossenen Ende des Innenstückes, das sich in ein massives Glasstück fortsetzt, ist mittels aufgekittetem Metallgewinde die abnehmbare Holzantriebsscheibe *Sch* befestigt. Auf dem anderen offenen Ende, das aus dem Außenmantel noch ein Stück hervorragt, sitzt locker eine Metallscheibe *E*, eine Druckfeder *F* und ein aufgeschraubtes Endstück *V*, das ein Abgleiten der Feder verhindert. Durch die Feder wird das Innenstück des Hahnes stets leicht in den Mantel hineingedrückt.

Zum Gebrauch füllt man das gesamte Innenstück mit dickflüssiger Vaseline und verschließt die Öffnung mit dem Korkstopfen *K*. Die Fettverteilung in hauchdünner Schicht geschieht durch das Loch *L* automatisch in geeignetem Maße. Die Gaszuführung wird an *Z*, die Gasableitung für die einzelnen Gefäße an *A* und weiteren dieser Ansatzstücke mit Schlauch befestigt. Der Hahn wird in einer Stativklemme stabil eingeklemmt (am besten mit wagerechter Längsachse) und durch einen Motor mit dem Wunsch entsprechender Tourenzahl in Umdrehung versetzt. Dabei wird das Gaszuführungsrohr *Z* zwangläufig mit den einzelnen Ableitungsrohren während jeder Umdrehung verbunden. Ableitungsrohre, die nicht benutzt werden, werden mittels daran befindlicher Hähne verschlossen.

Dieser aus Glas gefertigte Verteilerhahn arbeitet tagelang, ohne der Wartung zu bedürfen.

Sämtliche beschriebenen Apparate fertigt die Glasbläserei von Alois Schmidt, Breslau, Schuhbrücke 42, an.

Über eine rationelle Charakterisierung der Fette mittels Kennzahlen.

Von

Ph. Bamberger.

(Aus der Universitäts-Kinderklinik Greifswald.)

(Eingegangen am 11. Juli 1927.)

Die Kennzahlen sind ein bequemes Mittel, um Fette nach ihren chemischen Eigenschaften zu charaterisieren.

Die wichtigsten sind die folgenden:

1. *Der Säuregrad,* d. i. die Anzahl der Kubikzentimeter n Alkalilauge, die zur Neutralisation der freien Fettsäuren in 100 g Substanz nötig sind. 2. *Die Verseifungszahl,* sie gibt die Milligramme Kaliumhydroxyd an, die zur Verseifung von 1 g Fett erforderlich sind. 3. *Die Reichert-Meisslsche und Polenskesche Zahl.* Die *Reichert-Meissl*sche Zahl gibt die Kubikzentimeter n/10 KOH an, welche zur Neutralisation der aus 5 g Fett unter bestimmten Bedingungen abdestillierten, flüchtigen, wasserlöslichen Fettsäuren erforderlich sind. Die *Polenske*sche Zahl, ebenso die zur Neutralisation der abdestillierten, flüchtigen, in Wasser unlöslichen Fettsäuren nötigen Kubikzentimeter n/10 KOH. 4. *Die Jodzahl.* Sie gibt an, wieviel Halogen, ausgedrückt in Prozenten Jod, ein Fett oder eine Fettsäure aufnehmen kann.

Die Kennzahlen waren ursprünglich verwendet, um, wie ihr Name sagt, an Hand von Standardwerten oder Tabellen ein Urteil über Herkunft und Reinheit eines Fettes oder Öles zu erhalten. Ihre hauptsächlichste Anwendung lag deshalb auf dem Gebiete der Technologie der Fette. Konkrete Folgerungen über die molekulare Zusammensetzung des untersuchten Materials wurden nicht gezogen. Das Interesse der Technik war erschöpft mit der Feststellung, ob das untersuchte Material den als nötig erkannten Forderungen der Analyse gerecht wurde oder nicht.

Dies ändert sich jedoch, wenn man die Fette von anderen Gesichtspunkten aus betrachtet. Wenn vom biologischen Standpunkt aus die Zusammensetzung etwa in Hinsicht auf Fettabbau und Fettaufbau interessiert. Man kann sich dann nicht mehr mit einem kleinen Ausschnitt, mit einem einzigen Vergleichspunkt begnügen, man muß ein möglichst vollständiges und übersichtliches Bild von Art und re-

lativer Menge der Komponenten eines Fettes haben. Dazu sind die Kennzahlen in ihrer jetzigen Form nicht fähig. So kann man z. B. aus der Verseifungszahl durchaus keinen eindeutigen Schluß auf das Molekulargewicht der Fettsäuren ziehen, wenn man nicht die beiden anderen beeinflussenden Faktoren, nämlich den Gehalt an Unverseifbarem und an Mono- und Diglyceriden zahlenmäßig kennt. Ferner zeigt ein Blick auf die eingangs angeführten Definitionen der Kennzahlen, daß jede derselben in einer anderen Einheit gerechnet wird. Diese konventionellen Einheiten haben überdies nicht nur untereinander, sondern auch mit den in der organischen Chemie als praktisch eingebürgerten Rechnungsgrößen einen so losen und unübersichtlichen Zusammenhang, daß eine klare Vorstellung der molekularen Zusammensetzung eines Fettes nur schlecht vermittelt wird.

Wenn man auch bis jetzt diese Einheiten beibehalten hat, so wurde doch bald das Unerquickliche dieser Lage gefühlt und es sind Ansätze zu dessen Beseitigung vorhanden. So wurde statt des Säuregrades von *Köttstorfer* die Säurezahl eingeführt, die in der gleichen Einheit gezählt wird wie die Verseifungszahl. Man hat auch, um den Zusammenhang mit der übrigen Chemie herzustellen, die Säurezahl in Prozenten an Ölsäure oder Schwefelsäureanhydrid angegeben. Es ist aber ohne weiteres ersichtlich, daß diese willkürliche Bezugnahme auf eine beliebige Fettsäure oder gar auf eine anorganische Säure kein Bild der Zusammensetzung des Fettes ergeben kann.

Der Versuch *Allens*, statt der Verseifungszahl das Verseifungsäquivalent einzuführen, das ist die Fettmenge, die durch ein Mol KOH verseift wird, hat den Kernpunkt der Sache nicht getroffen, denn damit ist eine neue Einheit eingeführt, und nicht einmal eine, die mehr aussagt oder anschaulicher wäre als die alte.

Dagegen kann eine ganz einfache Umformung, die weder etwas präsumiert, noch präjudiziert, die Sachlage mit einem Schlage ändern. Wir brauchen nur die Kennzahlen, die sich ja alle nur auf Fettsäuren beziehen, in einer einzigen Einheit auszudrücken, und zwar in einer, die zugleich den Zusammenhang mit der organischen Chemie vermittelt, und dann die einzelnen Komponenten mit der Gesamtzahl der Fettsäuren zu vergleichen.

Zu diesem Zweck müssen wir vorerst feststellen, wieviel Millimol Fettsäuren insgesamt (frei oder verestert) in 1 g Fett vorhanden sind. Diese Zahl ist natürlich gleich der Anzahl der zur Verseifung verbrauchten Kubikzentimeter n KOH (da die Verseifungszahl bestimmt wird durch Titration mit n oder n/2 KOH und H_2SO_4, so ist die Zahl ohne weitere Rechnung ablesbar). Man hat sofort eine bestimmte Vorstellung, wenn man weiß, daß 1 g Fett insgesamt *a* Millimol Fettsäuren enthält; ganz genau wie man eine bestimmte Vorstellung hat

von einer n Säure, nämlich daß 1 Liter 1 Äquivalent einer beliebigen Säure enthält, und man (cum grano salis) gar nicht zu wissen braucht, ob HCl oder H_2SO_4, oder Essigsäure, oder gar ein Gemisch von verschiedenen Säuren vorliegt, die zusammen eben gerade die Normalität ausmachen. Und in unserem Falle enthält 1 g Fett *a* Millimol $H^{\cdot}$, also *a* Millimol Fettsäuren der allgemeinen Formel R—COOH, wobei R jede beliebige Zusammensetzung haben kann.

Damit ist fast alles getan. Man braucht nur ebenso zu verfahren bei den anderen Kennzahlen, d. h. man muß nur angeben, wieviel Kubikzentimeter n NaOH zur Neutralisation der freien Fettsäuren in 1 g Fett nötig sind, um die Millimole freier Fettsäuren in 1 g Fett zu erhalten. Dies wäre die neue Säurezahl. Ganz ebenso geschieht es mit der *Reichert-Meissl*schen und *Polenske*schen Zahl. Die Jodzahl kann genau in der gleichen Weise angegeben werden, d. h., man gibt den Verbrauch an 2 n Jodlösung in Kubikzentimeter an (2 n, weil ja jede Doppelbindung 2 Jod addiert) und hat damit die Anzahl der Doppelbindungen in derselben Einheit ausgedrückt wie die anderen Kennzahlen.

	Verseifung	Neutralisation	Flüchtige wasserlösliche Säuren	Flüchtige wasserunlösliche Säuren	Jodbindung
1 g Subst. verbrauchte	6,92 ccm n/2 KOH	0,69 ccm n/10 KOH	6,22 ccm n/10 KOH	4,49 ccm n/10 KOH	14,52 ccm n/10 J-Lösung
Ansatz für die alten Kennzahlen	6,92 . 28,95	0,69 . 5,61	6,22 . 5	4,49 . 5	14,52 . 0,0127 . 100
Alte Kennzahlen: Name	Verseif.-Zahl	Säurezahl	R.-M.-Zahl	Pol.-Zahl	Jodzahl
Alte Kennzahlen: Wert	149 mg KOH pro 1 g Fett	3,87 mg KOH pro 1 g Fett	31,1 ccm n/10 KOH pro 5 g Fett	22,5 ccm n KOH pro 5 g Fett	18,6 g Jod pro 100 g Fett
Neue Kennzahlen	3,46	0,069	0,622	0,449	0,727
Das bedeutet: Millimol in 1 g Fett	Gesamt-Fettsäuren	Freie Fettsäuren	Fl. wasserl. Fettsäuren	Fl. unlösl. Fettsäuren	Ungesättigte* Fettsäuren
Prozentuale Zusammensetzung	100	2,0	18,0	13,1	21,6

* Hierbei ist allerdings die stillschweigende Voraussetzung gemacht, daß keine Säuren mit mehr als einer Doppelbindung vorhanden sind. Exakter, aber auch weniger anschaulich kann man diesen Wert bezeichnen mit „Doppelbindungen"; diese kann man natürlich ebensogut auf die Gesamtheit der Carboxylgruppen, also der Fettsäuren beziehen.



Jetzt, da alle diese Werte in der gleichen Einheit angegeben sind, kann man auch sofort ein Bild über die molekulare Zusammensetzung gewinnen, wenn man alle Kennzahlen auf die Hauptkennzahl bezieht, d. h. auf die Verseifungszahl, die ja die Gesamtmenge an Fettsäure in 1 g Substanz angibt. Die Tabelle zeigt das und zugleich die vereinfachte Berechnung gegenüber den alten Kennzahlen.

Diese Berechnungsmethode wurde in einem größeren Stoffwechselversuch an wachsenden Tieren zum ersten Male angewandt. Dabei hat sich gezeigt, daß sich diese Umformung der Kennzahlen rechtfertigt und bewährt: Mit ihrer Hilfe konnte ein klares Bild über die Beteiligung der charakteristischen Fettsäuren am Aufbau von Organfetten gewonnen werden.

Eine Methode der quantitativen Bestimmung tierischer Organfette.

Von

Philipp Bamberger.

(Aus der Universitäts-Kinderklinik Greifswald.)

(Eingegangen am 11. Juli 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Im Rahmen eines Stoffwechselversuchs, den *Degkwitz* und seine Mitarbeiter in der Monatsschrift für Kinderheilkunde vor 2 Jahren im Auszug veröffentlichten (1) und dessen Gesamtveröffentlichung in der Zeitschrift für Kinderheilkunde 1927 erfolgt, hatte ich die Aufgabe, das Körperfett der Versuchstiere qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Dabei hat sich herausgestellt, daß keine der bisherigen Methoden der Fettbestimmung das leistet, was man im biologischen Versuch verlangen muß: Quantitative Isolierung des Fettes ohne Verunreinigungen bei Wahrung seiner Integrität.

Ich habe nun eine Methode zur Isolierung des Fettes aus den Organen ausgearbeitet und konnte im Laufe des *Degkwitz*schen Versuchs an Hand einer großen Zahl von gut stimmenden Doppelanalysen feststellen, daß die Methode die notwendige Genauigkeit besitzt. Die Methode soll beschrieben und begründet werden.

I. Allgemeines über die Fettbestimmung in tierischen Organen.

Die üblichen Methoden der Fettbestimmung in tierischen Organen sind im wesentlichen die Modifikationen zweier verschiedener Prinzipien (2).

Das eine, ältere Prinzip ist die Extraktion des getrockneten Organs mit verschiedenen Fettlösungsmitteln. Bei allen Methoden dieser Art ist das Bestreben vorherrschend, das Maximum an Extrahierbarem, also an lipoidlöslichen Substanzen festzustellen. Dieses Ziel sollte erreicht werden teils durch Wahl eines besonders guten Lösungsmittels (wobei vor allem der hochsiedende Alkohol Vorteile vor den übrigen Mitteln zu bieten schien), teils durch Aufschluß der Zelle, mit Hilfe von Pepsin oder durch Zerkochen mit HCl.

Das andere Prinzip ist die Isolierung der gesamten Fettsäuren, wie sie von *v. Liebermann* und *Székely* (3) sowie von *Kumagawa* und *Suto* (4) ausgearbeitet wurde.

Kumagawa und *Suto* (4) haben darauf hingewiesen, daß man mit den Methoden des ersten Prinzips (Extraktion) bei der Bemühung, eine möglichst große Ausbeute zu erzielen, dies auf Kosten der Reinheit des Materials tut und trotzdem noch eine größere oder geringere Menge an Fett nicht mitbestimmt. So ergaben nach *Kumagawa* von denjenigen Extraktionsmethoden, die in höchstem Ansehen stehen, die Alkoholextraktion von *Rosefield* 17 bis 46% zuviel, und die Extraktion mit Äther und P.-Äther von *Soxhlet* und *Voit* 10% zuwenig.

Die Ursache des Mißerfolges ist einmal darin zu suchen, daß die Fettlösungsmittel besonders in Gegenwart von Lipoiden noch andere, nicht fettartige Substanzen aufnehmen, die das Resultat enorm fälschen können. P.-Ätherextrakt ist nach *Kumagawa* noch am meisten von diesem Fehler frei. Ferner wird ein Teil des Fettes durch Eiweißumhüllung vor dem Zutritt des Extraktionsmittels geschützt und entzieht sich so der Bestimmung. Dieses Fett wird vor allem das der arbeitenden Zelle sein und nicht das Depotfett. Aber gerade die Zusammensetzung dieses Zellfettes interessiert ja vom biologischen Standpunkt aus. Also ist ein Fehler in dieser Hinsicht besonders irreführend. Man kann die Ausbeute bei dieser Methode durch Intensität des Pulverisierens bedeutend erhöhen. Der Fehler wird jedoch nie gleich Null werden. Diese letzten, von Eiweiß eingehüllten Reste an Fettsubstanz suchte *Nerking* durch Zerkochen des Organpulvers mit HCl zu erhalten (5). Wenn auch HCl die Triglyceride nicht wesentlich angreift, so ist doch eine Hydrolyse der Phosphatide und übrigen Lipoide der Zelle unvermeidlich. Andere, *Pflüger* und *Dormeyer* (6), sowie *Glikin* (7), haben den Organbrei mit Pepsin und Salzsäure verdaut, um die Eiweißhülle zu entfernen und nachher durch Extraktion den Rest an Fett zu erhalten. Nach *Kumagawa* und *Suto* ist der Erfolg dieser Operation für Ausbeute und Reinheit recht gering. Der Extrakt ist nach *Kumagawa* mit 16 bis 40% nicht fettartiger Stoffe verunreinigt, und trotzdem entgehen bis zu 10% Fettsubstanz der Bestimmung.

Auf Grund dieser Angaben halten es *Kumagawa* und *Suto* für ein unmögliches Beginnen, nach einer dieser Methoden das Organfett quantitativ und in der nötigen Reinheit zu isolieren. Sie kommen zu dem Schluß, daß die Isolierung der gesamten Fettsäuren nach Verseifung des ganzen Organbreies einzig und allein richtige Resultate liefern kann. Schon vor ihnen haben *v. Liebermann* und *Székeli* diesen Weg beschritten. *Kumagawa* und *Suto* werfen jedoch ihren Vorgängern vor, viel zu viel niedrige Fettsäuren mitzubestimmen, die nach ihrer Ansicht nicht aus den fettartigen Bestandteilen des genuinen Fettes entstanden sein können, sondern Zerfallsprodukte des Eiweißes sein sollen. *Kumagawa* und *Suto* halten es einzig und allein für richtig, nur die *hoch*molekularen Fettsäuren von C_{16} an zu bestimmen, ja sie legen den größten Wert auf die Feststellung, daß die von ihnen isolierten Fettsäurengemenge der Elementaranalyse noch diesen Bedingungen entspreche. Abgesehen davon, daß es unzulässig erscheint, einfach auf Grund von Elementaranalysen aus einem Gemisch von Säuren unbekannter Herkunft eine bestimmte prozentuale Zusammensetzung ganz bestimmter Fettsäuren schließen zu wollen, und das ohne jede Titration des Gemenges, ist es durchaus unrichtig, den Gehalt an niedrigen Fettsäuren außerhalb des Kreises der Betrachtungen stellen zu wollen. Palmitin-,

Stearin- und Ölsäure sind Endprodukte (und nicht einmal alle Endprodukte) des Fettstoffwechsels. Deshalb sind sie die Hauptvertreter der Fettsäuren im Depotfett. Die niedrigen Fettsäuren dagegen, gerade weil sie für Arbeit und Gedeihen der Zelle eine so wichtige Rolle spielen, werden nicht zur Disposition gestellt und sind deshalb ebensowenig wie Phosphatide, Cholesterine und Vitasterine als integrierender Bestandteil des Depotfettes zu finden. Es ist kein Zufall, daß gerade das Milchfett verschiedener Tiere, das ja den gesamten Bedarf des wachsenden Organismus decken muß, besonders große Mengen niedriger Fettsäuren enthält, während das Depotfett derselben Tierspezies einen weit geringeren Gehalt daran hat. So hat z. B. Kuhmilchfett die *Reichert-Meissl*sche Zahl 28,8, während sie für Rindertalg mit 0,5 angegeben ist.

Aber noch andere Fragen der Fettzusammensetzung sind für den Chemismus der Zelle von mindestens der gleichen Bedeutung wie der Gehalt an niederen Fettsäuren.

Die Menge und Zusammensetzung der verschiedenen Lipoide (Lecithin, Kephalin, Cerebrin und Kerasin) ist ein wichtiges Problem für die Funktion der Zelle. Die Differenzierung der Lipoide ist freilich noch nicht restlos geglückt, aber schon die Bestimmung der Phosphorsäure und die Isolierung und Bestimmung der stickstoffhaltigen Bestandteile können uns ein annäherndes Bild über Menge und Art der Lipoide geben.

Das Verhältnis von Cholesterin zu Cholesterinester scheint ebenfalls von hoher Bedeutung für das Zellgeschehen zu sein (8) (9) (9a).

Ferner ist der Gehalt des Zellfettes an freier Fettsäure von Interesse, und wenn auch seine Bedeutung und seine Beziehungen zu anderen Funktionen noch nicht erkannt sind, so liegt das wohl vor allem an der geringen Beachtung, die man bisher diesen Dingen entgegengebracht hat.

Die Methode von *Kumagawa* nun, so zuverlässig sie das ihr gesteckte Ziel, nämlich die Bestimmung der hochmolekularen Fettsäuren erreicht, so unzulänglich ist sie, sobald man sich auch nur über einige dieser oder anderer Fragen der Biochemie der Fette Auskunft holen will.

Diese Nachteile der Verseifungsmethode, wie wir sie nennen wollen, haben mich veranlaßt, die Extraktionsmethode so umzugestalten, daß ihre Fehler in erträglichen Grenzen bleiben.

Vor allem der Gedanke von *Pflüger* und *Dormeyer* schien viel zu wertvoll, um ihn nach diesen ersten Mißerfolgen ganz aufzugeben. Es mußte doch prinzipiell möglich sein, die Eiweißhülle von den Fetteilen durch elektive Verdauung zu entfernen, gleichgültig, ob diese Hülle nun Zellmembran sei oder ein Kunstprodukt und während des Trocknens entstanden. Die Fortschritte der Fermentchemie in den letzten Jahren ermutigten dazu, diese Methode von neuem anzugreifen und so auszugestalten, daß brauchbare Resultate erhalten wurden.

Die Werte nach *Pflüger* und *Dormeyer* werden, wie *Kumagawa* ausführt, vor allem dadurch gefälscht, daß der Extrakt eine große Menge ätherlöslicher Stoffe aufnimmt, die offensichtlich mit Fett gar nichts zu tun haben, sondern als Eiweißabbauprodukte anzusehen sind.

Die Methode mußte nach drei Richtungen hin abgeändert werden:

1. Das Eiweiß mußte nach der peptischen Andauung mit einem anderen proteolytischen Ferment zu Ende verdaut werden. Es wurde dazu Trypsin gewählt. Das war aber erst möglich, seit es gelungen war, lipasefreies Trypsin zu gewinnen; die Integrität des genuinen Fettes mußte natürlich unbedingt gewahrt werden.

2. Die Verdauung wurde in einer Dialysierhülse ausgeführt, einmal um die diffusiblen Produkte abzugeben und so das Gleichgewicht zwischen unverdautem und abgebautem Eiweiß stets zugunsten unserer Absichten zu verschieben. Zum anderen Mal, um die Eiweißabbauprodukte, die den Extrakt von *Dormeyer* und *Pflüger* so weitgehend verunreinigten, nach Möglichkeit von vornherein zu verringern.

3. Der erhaltene Extrakt mußte von den noch vorhandenen Verunreinigungen befreit werden.

II. Die Grundlagen der neuen Methode.

a) Das Pepsin.

Zur Verdauung mit Pepsin und Salzsäure wurde einfach ein verdünnter salzsaurer Auszug aus der Magenschleimhaut gewählt, wie es *Kumagawa* (10) angegeben hat. Ein gesäuberter großer Schweinemagen wird aufgeschnitten, die Schleimhäute, nach Reinigung am Wasserhahn, abgeschabt und in 1 Liter 0,5%iger HCl bei 35 bis 40° 15 bis 20 Stunden lang digeriert; dann wurden 20 g Blutkohle zugesetzt und nach einer halben Stunde filtriert.

Prüfung A. Die peptische Wirksamkeit ist jedesmal vorhanden, sie kann leicht nachgewiesen werden, indem man ein Flöckchen gut gewaschenen Fibrins mit der Lösung versetzt und dann im Brutschrank einige Stunden verweilen läßt. Eine quantitative Bestimmung ist unnötig.

B. Lipatische Wirkung: Die Magenlipase konnte eventuell stören, obwohl dies nach den Angaben von *Fromme* und *Vollhard* unwahrscheinlich ist, da sie 1. von Pepsinsalzsäure in wenigen Stunden vollkommen zerstört wird, 2. von Blutkohle absorbiert wird. Trotzdem habe ich mehrere quantitative Versuche angestellt, die stets ergebnislos verliefen.

Tabelle 1.

Schweinefett g	Säurezahl vor der Verdauung	Säurezahl nach der Verdauung
5,031	0,34	0,34
4,842	0,33	0,34
2,414	0,35	0,35

b) Das Trypsin.

Die Lösung des reinen lipasefreien Trypsins, die zur Aktivierung nötige Enterokinaselösung und die Pufferlösung wurden nach den Angaben von *Willstätter*, *Waldschmidt-Leitz* und *Memmen* (11) hergestellt. Die Einzelheiten der Darstellung und Reinigung sind im Original genau beschrieben, daher erübrigt sich jede nähere Ausführung.

In einem Punkte bin ich von den Angaben von der Originalliteratur abgewichen: Ich habe die Adsorption der Lipase an Tonerdesuspension (B) zweimal wiederholt und den relativ großen Verlust an Trypsin gern in Kauf genommen gegenüber dem Gewinn, ein lipasefreies Präparat zu erhalten.

Die Prüfung der Trypsinlösung: A. Die tryptische Wirkung wird ganz analog nachgewiesen wie die Wirksamkeit des Trypsins. Eine quantitative Bestimmung der tryptischen Wirkung ist ebensowenig nötig wie beim Pepsin.

B. Die lipatische Wirkung wurde nach der von *Waldschmidt-Leitz* und *Memmen* angegebenen Titrationsmethode (mit wechselndem p_H) geprüft. Das Ergebnis ist in Tabelle II zu sehen.

Tabelle II.

Schweinefett g	Verbrauch an n/10 KOH vor dem Versuch ccm	Verbrauch an n/10 KOH nach dem Versuch ccm
0,314	0,71	0,72
0,256	0,70	0,70
0,281	0,70	0,72

c) Die Dialysierhülsen.

Ich benutzte Kollodiumhülsen, die der Haltbarkeit wegen auf Extraktionshülsen von *Schleicher* und *Schüll* niedergeschlagen werden. Die Hülsen werden, ähnlich wie dies in dem Praktikum für Kolloidchemie von *W. Ostwald* beschrieben ist, mit 4%iger Kollodiumlösung ausgegossen, 5 Minuten getrocknet, noch einmal ausgegossen und nach nochmaligem Trocknen (5 Minuten) außen mit einer gleichmäßigen Schicht von Kollodium überzogen durch Eintauchen der Hülse in Kolloidumlösung bis an den Rand. Beim Trocknen muß man natürlich, wie das überall beschrieben ist, durch Drehen und Schwenken sowohl für gleichmäßige Schichtdicke, als auch für gleichmäßige Verdampfung des Äthers sorgen. Nach dem Auftragen der letzten Kolloidumschicht wird ein vorher aufgepaßter Glasring, der bequem in die Hülse hereingehen aber gut schließen muß, in die Hülse geschoben und mit Kollodium festgeklebt. 10 Minuten nach dem Auftragen der letzten Schicht wird die nun fast fertige Hülse bis 1 bis 2 cm unter dem Rand mit kaltem Wasser gefüllt und ebensoweit in eine Wanne mit kaltem Wasser gesteckt. Dabei ist zu beachten, daß der obere Rand absolut trocken bleibt. Sobald der Kollodiumkitt zwischen Hülse und Glasring trocken ist, wird er noch zwei- bis dreimal erneuert. Dann hat er im allgemeinen die genügende Dicke erreicht. 20 Minuten nach dem letzten Auftragen des Kollodiumkittes wird die Hülse herausgenommen, mit einem 1 bis 2 cm breiten Streifen Pergamentpapier in zwei- bis dreifacher Lage umwickelt, der dann mit Kupferdraht so festgebunden wird, daß an beiden Seiten starke Träger aus Draht etwa 2 bis 3 cm weit herausragen (s. Abbildung).

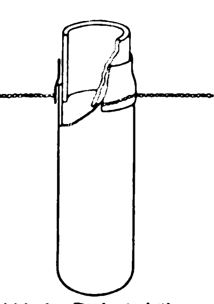


Abb. 1. Dialysierhülse, etwa 1/2 nat. Größe.

Die Hülse ist jetzt sowohl dicht als auch fest genug, um die langdauernde Dialyse auszuhalten. Beim Aufbewahren der Hülse muß man stets daran denken, daß sie nicht trocken werden darf, da sie sonst völlig undurchlässig wird. Beim Aufbewahren in Wasser (man kann die ganz fertige Hülse ohne weiteres ganz ins Wasser senken) muß man durch Zugabe von einigen Kubikzentimetern Toluol Ansiedlung von Bakterien und Pilzen verhindern.

Prüfung auf Dichte: *A. Mit Nachtblau.* Etwa 0,5%iges Nachtblau oder Alkaliblaulösung wird in die Hülse gegeben und gegen destilliertes Wasser dialysiert. Es darf nichts diffundieren.

B. Gegen Fette. Die nach Vorschrift hergestellten Hülsen sind stets dicht gegen Fette. Zur Prüfung wurden einige Gramme wasserfreien Fettes (vorher prüfen!) in die Hülse gegeben und im Brutschrank mehrere Tage gegen 0,5%ige Salzsäure sowie gegen die Pufferlösung des Trypsins dialysiert, getrocknet, extrahiert und gewogen.

In der Tabelle III sind die Werte dieser Prüfung angegeben.

Tabelle III.

Schweinefett	
eingewogen g	gefunden g
0,3413	0,3406
0,6821	0,6827
0,2421	0,2420

d) Die Reinigung.

Die Extrakte von Organpulvern enthalten stets noch eine nicht unbeträchtliche Menge von Verunreinigungen, die mit den Fetten nichts zu tun haben und entfernt werden müssen. Schon die Wahl des Lösungsmittels ist hier von Wichtigkeit. Alkohol, der wegen seiner großen Extraktionsenergie gern als Extraktionsmittel gewählt wird, löst neben den Fetten besonders viel andere Stoffe. Weit besser ist schon Äther, aber die Menge der Verunreinigung ist trotzdem zu groß, um vernachlässigt werden zu können. Am elektivsten wirkt als Lösungsmittel P.-Äther. Seine Extraktionsenergie am Organpulver ist freilich wesentlich geringer als die des Äthers. Deshalb wählte ich als Extraktionsmittel Äther. Die Verunreinigung des Ätherextrakts kann man zu einem großen Teil entfernen durch Aufnehmen in P.-Äther. Die Verunreinigungen bleiben dabei ungelöst und können leicht durch Filtration abgetrennt werden. Aber auch auf diese Weise ist der Extrakt noch nicht rein genug zu erhalten. Dagegen kann man durch Ausschüttelung der P.-ätherischen Lösung mit verdünnter Salzsäure und Wasser den Extrakt rein genug erhalten.

Reinheit und Vollständigkeit der Extraktion habe ich geprüft am Stickstoffgehalt und am Gehalt der hochmolekularen Fettsäuren nach *Kumagawa*.

Diese beiden Größen sind nun freilich keine einwandfreien Kriterien für die Erreichung des Zieles. Es sind auch stickstofffreie Verunreinigungen im Fette möglich, und andererseits sind Lipoid-Stickstoff und Nicht-Lipoid-Stickstoff voneinander zu trennen. Der Gehalt an höheren Fettsäuren ist ebenfalls kein absolut zuverlässiger Maßstab, da, wie im ersten Teile

ausgeführt wurde, die niederen Fettsäuren nicht vernachlässigt werden dürfen. Doch müssen wir uns mit diesen Feststellungen begnügen, da bessere und eindeutige Kriterien für Reinheit und Vollständigkeit der Extraktion zurzeit nicht bestehen.

Die folgende Tabelle IV zeigt die Werte der Prüfungen.

Tabelle IV.

Analyse	Gewicht g	Vor der Reinigung N-Gehalt	Nach der Reinigung N-Gehalt	Hohe Fettsäuren	Waschwasser Gehalt an Fettsäuren g
1	1,84	0,0665 g = 3,62 %	0,0147 g = 0,80 %	1,6045 g = 87,2 %	0,0010
2	2,06	0,0739 g = 3,59 %	0,0169 g = 0,82 %	1,7758 g = 86,2 %	0,0008
3	3,11	0,1114 g = 3,60 %	0,026 g = 0,84 %	2,6872 g = 86,4 %	0,0014
4	2,00	0,0736 g = 3,68 %	0,0168 g = 0,835 %	1,7383 g = 86,9 %	0,0016

Der N-Gehalt ist also auf ein Fünftel seines ursprünglichen Wertes gefallen. Der Lecithingehalt des gereinigten Fettes berechnet sich aus dem Stickstoffgehalt zu 45,4 bis 47,7%.

Der Phosphorgehalt des gereinigten Fettes war in den ersten beiden Proben: 0,0207 g = 1,15%.
0,0233 g = 1,16%

Das entspricht einem Gehalt von 29,7 bzw. 29,9% Lecithin. Aus der Differenz zwischen dem Lecithinwert nach dem Stickstoffgehalt und dem nach dem P-Gehalt berechneten ergibt sich, daß 0,30 bis 0,32% Stickstoff zuviel gefunden wurden. Wenn wir dieses Stickstoffplus auf Eiweiß umrechnen, so ergibt sich eine Verunreinigung von 2%.

III. Beschreibung der Methode.

Das sorgfältig zerkleinerte Organ wird nach Wägung im Wasserbad, und zwar zur Vermeidung von Veränderungen während des Trocknens, im Vakuum bei 80 bis 90° getrocknet, was je nach der Menge des Organs und nach der Größe des Trockenapparates etwa 10 bis 12 Stunden dauert. Von der feinpulverisierten Substanz werden etwa 10 g auf 1% genau abgewogen und im Soxhletapparat mit Äther 6 Stunden lang extrahiert. Damit wird die Hauptmenge der Fettsubstanzen herausgeholt. Der Extrakt wird vom Äther befreit durch Abdampfen auf dem Wasserbad bei 50 bis 60° und 10- bis 16stündigem Aufenthalt im Trockenschrank (50 bis 60°). Dann wird es mit etwa der 100fachen Menge des Extraktes P.-Äther versetzt und quantitativ in einen gut schließenden Scheidetrichter übergeführt. Diese Lösung wird nun dreimal mit 10 bis 20 ccm 5%iger wässeriger Salzsäure ausgeschüttelt. Emulsionsbildung kann durch Zusatz von wenig NaCl und eventuell

einigen Kubikzentimetern Alkohol ziemlich leicht vermieden werden. Schließlich wird noch dreimal mit 10 bis 20 ccm Wasser ausgeschüttelt. Das Wasser der letzten Ausschüttelung muß gegen Lackmus neutral reagieren. Die P.-ätherische Lösung wird nun durch ein trockenes kleines Filter oder besser durch Watte filtriert.

Der Extraktionsrückstand wird nach Entfernung des Äthers in eine der beschriebenen Verdauungshülsen eingefüllt. Die Größe der Hülse muß so bemessen sein, daß das Pulver nicht mehr als ein Drittel bis ein Halbes des Volumens der Hülse ausmacht. Bei kleineren Hülsen kommt es nämlich sonst während der Verdauung durch die Drucksteigerung der osmotisch wirksamen Eiweißabbauprodukte zum Herausquellen des Inhaltes. Wenn die Hülsen sorgfältig angefertigt sind, ist die Porenweite derart, daß Salze und die übrigen niedrig molekularen Stoffe gut diffundieren.

In die Hülse wird nun die Pepsinsalzsäurelösung gegossen, und zwar etwa 1 bis 2 cm bis unter den Rand (das endgültige Niveau stellt sich während der Dialyse selbsttätig ein). Die Hülse wird mit einem trockenen Zellstoffpfropfen, der kurz durch die Bunsenflamme gezogen ist, gut verschlossen und mit Hilfe der zwei Drahthaken, welche diametral vom Glasring ausgehen, in einen Dialysiertrog gesenkt.

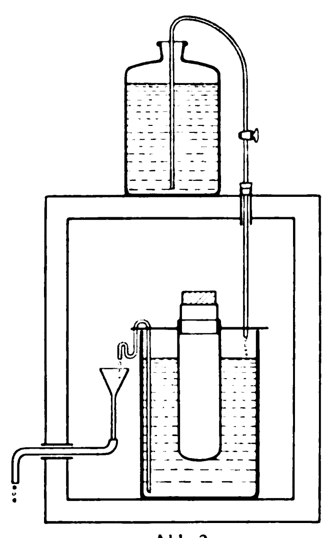


Abb. 2.
Einmontierung der Dialysierhülse in den Brutschrank; etwa $1/4$ nat. Größe.

Zur ständigen Erneuerung des umgebenden Wassers wird die von *Wiechowsky* angegebene Anordnung verwandt (12). Man kann selbstverständlich eine große Anzahl von Verdauungshülsen zugleich in diesem Trog halten. Die Apparatur wird nun in einen Brutschrank einmontiert.

Die Temperatur beträgt 37°. Die Waschflüssigkeit des Troges besteht aus 0,5% Salzsäure, der einige Kubikzentimeter Chloroform oder Toluol zugesetzt sind. Auf diese Weise wird Ansiedlung von Schimmelpilzen und Bakterien fast sicher verhütet. Der Zulauf der Waschflüssigkeit wird so geregelt, daß pro 10 g zu verdauender Substanz etwa 200 bis 300 ccm in 24 Stunden verbraucht werden.

Die Verdauung mit Pepsin ist im allgemeinen in 6 bis 8 Tagen beendigt. Nach dieser Zeit wird das Waschwasser durch reines Wasser

ersetzt und so lange gespült, bis die Chlorreaktion nur noch schwach positiv ausfällt.

Die Verdauung hat nun einen großen Teil an Eiweiß entfernt, die Waschflüssigkeit ist stark gefärbt und der Hülseninhalt hat etwa zwei Drittel bis vier Fünftel an Trockengewicht verloren. Im Mikroskop sind Zellreste kaum noch zu sehen.

Nun wird die Substanz mit Trypsin zu Ende verdaut. Man gibt von der gereinigten Trypsinlösung, wie oben beschrieben, 30 bis 40 ccm in die Hülse; vorher muß durch Zusatz von n NaOH die Wasserstoffionenkonzentration auf $p_H = 8$ gebracht werden. Wenn der Inhalt der Hülse, wie das meist der Fall ist, nicht mehr als die Hälfte beträgt, kann die Trypsinlösung ohne weiteres mitsamt der nötigen Puffermenge zugegeben werden, wenn nicht, muß die entsprechende Menge herauspipettiert und im Vakuum eingedampft werden. (Es ist darauf zu achten, daß während dieser Operation die Hülse nicht trocken wird.) Nach Zusatz des Trypsins und der Pufferlösung wird die Hülse genau wie beim Pepsin beschrieben, verschlossen, in den Dialysiertrog gesenkt und im Brutschrank bei 37° 2 bis 3 Tage belassen. Die Waschflüssigkeit, die im gleichen Tempo spült, besteht jedoch in diesem Falle aus einer Mischung von n/2 K_2HPO_4 und n/2 NaOH im Verhältnis 5 : 2, die zum Gebrauch mit destilliertem Wasser auf das Vier- bis Fünffache verdünnt wird. Auch hier muß zur Vermeidung von bakteriellen Verunreinigungen Toluol zum Waschwasser zugesetzt werden.

Nach 2 bis 3 Tagen wird die Verdauung abgebrochen, indem man wieder einige Zeit mit neutralem Wasser dialysiert. Darauf wird die Hülse herausgenommen, dicht unter dem Rande des Glasringes abgeschnitten, ausgeleert, ausgespült und in kleine Stücke zerschnitten. Der Ring wird ebenfalls sorgfältig ausgespült. Der Verdauungsrückstand, der jetzt $^1/_{10}$ bis $^1/_{20}$ des organischen Pulvers beträgt und keine Zellreste mehr zeigt, wird mitsamt der Hülse im Vakuum zur Trockne verdampft (60°). Der trockene Rückstand wird quantitativ in eine kleine Extraktionshülse gebracht (wobei die letzten Reste mit heißem Alkohol nachgespült werden) und dann in einem Soxhletheißextraktor mit etwa 20 ccm Alkohol extrahiert.

Der Extrakt enthält nun den Rest des Fettes und eine große Menge von Verdauungsprodukten des Eiweißes, die in Alkohol löslich sind. Die Reinigung wird genau so vorgenommen, wie beim Hauptextrakt.

Die P.-ätherische Lösung des gereinigten Extraktes wird nun mit dem ersten Extrakt vereinigt, dabei ist zu beachten, daß der erste Extrakt sich noch einmal vollständig lösen muß, wenn man am Schluß eine homogene Mischung vom ersten und zweiten Extrakt haben will.

Der P.-Äther wird wieder am Wasserbad bei 50 bis 60^0 abgedampft und der Extrakt im Trockenschrank bei derselben Temperatur zur Gewichtskonstanz gebracht, was etwa 2 bis 3 Tage in Anspruch nimmt.

Zu bemerken ist noch, daß die Aufbewahrung des ersten Extraktes bis zur Vereinigung mit dem zweiten keine Änderung der Zusammensetzung zur Folge hat, solange man Luftsauerstoff und vor allem Licht abhält.

So habe ich bei monatelangem Aufbewahren von Organfetten folgende Werte bekommen:

Tabelle V.

Nr.	Zeitpunkt der Untersuchung	Ges. Mol Fettsäure in 1 g	Freie Fettsäuren %	Doppelbindungen in % der Carboxylgruppen
1	Zu Anfang des Versuchs	4,41	7,0	48,4
	Nach 2 Monaten	4,40	7,1	48,5
2	Zu Anfang des Versuchs	3,82	2,61	39,8
	Nach 2 Monaten	3,83	2,63	39,6
3	Zu Anfang des Versuchs	4,45	5,51	39,3
	Nach 2 Monaten	4,43	5,51	39,7

Die eingangs erwähnte Arbeit war der Prüfstein der neuen Methode: Dabei konnte in mehr als 50 Doppelanalysen ihre Brauchbarkeit für biologische Untersuchungen erwiesen werden.

Literatur.

1) *Degkwitz, Bamberger, Ebert* usw., Monatsschr. f. Kinderheilk. **29**, 592, 1925.; s. auch die demnächst in der Zeitschr. f. Kinderheilk. erscheinende zweite Abhandlung. — 2) *Abderhalden*, Handb. d. biochem. Arbeitsmethod. 2. Aufl., **6**, Abt. 1. — 3) *v. Liebermann* und *Scékely*, Arch. f. d. ges. Physiol. **72**, 360. — 4) *Kumagawa* und *Suto*, diese Zeitschr. **8**, 212. 1908. — 5) *Nerking*, Arch. f. d. ges. Physiol. **73**, 172. — 6) *Pflüger*, ebendaselbst **51**, 277; *Dormeyer*, ebendaselbst **65**, 90. — 7) *Glikin*, ebendaselbst **95**, 107. — 8) *Neubauer* und *Porges*, diese Zeitschr. **9**, 312. — 9) *Degkwitz* und *Zoelch*, Klin. Wochenschrift 1925. — 9a) *Windaus*, Zeitschr. f. phys. Chem. **65**, 110. — 10) *Kumagawa*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **4**, 189. — 11) *Willstätter*, *Waldschmidt-Leitz* und *Memmen*, Zeitschr. f. phys. Chem. **125**, 93 und 132; **132**, 181. — 12) *Wiechowsky*, Hofmeister Beitr. **9**, 243.

Eine jodometrische Methode zur Bestimmung der Homogentisinsäure im Harn.

Von

Ernst Metz.

(Aus der medizinischen Klinik des Hospitals zum heiligen Geist, Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 1. August 1927.)

Zur quantitativen Bestimmung der Homogentisinsäure im Harn wurde bis jetzt ausschließlich die Methode von *Wolkow* und *Baumann*[1] angewandt. Sie beruht auf der Fähigkeit der Homogentisinsäure, ammoniakalische Silberlösung zu reduzieren. Es wurde schon mehrfach, besonders von *Katsch* und seinen Schülern auf die Nachteile dieser Methode hingewiesen: 1. Es ist zur Ermittlung des Endpunktes der Reaktion eine mehrmalige Wiederholung der Titration nötig, wodurch 2. eine größere Menge Urin gebraucht wird.

Eine Modifikation der Methode zur Vermeidung der mehrmaligen Wiederholung der Titration gibt *Denigés*[2] an. Die Methode hat sich nicht eingeführt, wohl weil die Titration mit Cyankali weniger üblich ist. Angaben über die Brauchbarkeit liegen nicht vor. Eine weitere Vereinfachung der *Baumann*schen Methode habe ich versucht mit Filtration des abgeschiedenen Silbers durch ein feinporiges Glasfilter, Lösen des Silbers in Salpetersäure und Titration des Silbernitrats mit n/10 Ammonrhodanid, ohne wesentliche Vorteile zu erzielen.

Für die gegenwärtige Alkaptonurieforschung ist aber eine rasche Methode, die erlaubt, Serienbestimmungen mit geringen Urinmengen auszuführen, unbedingt erforderlich. Das ergab sich besonders kürzlich bei einer Arbeit, die den Nachweis der Homogentisinsäure im Serum des Alkaptonurikers zum Gegenstand hatte[3]. Deshalb habe ich eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung der Homogentisinsäure im Harn ausgearbeitet, welche die Nachteile der *Baumann*schen Methode nicht besitzt.

---

[1] Zeitschr. f. physiol. Chem. **16**, 268, 1892.
[2] Journ. de pharmacie et de chimie, 6. Serie, **5**, 50, 1897.
[3] *Katsch* und *Metz*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 1927.

Versetzt man Homogentisinsäure in bicarbonatalkalischer oder boraxalkalischer Lösung mit n/10 Jodlösung bis zur Blaufärbung von Stärke, so findet eine quantitative Oxydation zu Chinonessigsäure

$$(OH)_2C_6H_3\text{—}CH_2COOH + J_2 \rightleftarrows O_2C_6H_3\text{—}CH_2COOH + 2\,HJ$$

im Sinne der Gleichung statt, ein Prozeß, der reziprok ist. Säuert man die Lösung an, so findet die umgekehrte Reaktion statt unter quantitativer Abscheidung der verbrauchten Menge Jod, das mit n/10 Natriumthiosulfatlösung zurücktitriert werden kann. Die Reaktion beruht auf der leichten Oxydierbarkeit der Homogentisinsäure und ist durch die beiden para-ständigen Hydroxylgruppen des Benzolkernes bedingt. Zuerst wurde diese Reaktion von *Walter M. Gardner* und *Herbert H. Hogdson*[1] und *Wieland*[2] zur quantitativen Bestimmung des Hydrochinons benutzt.

Auf Grund folgender Bestimmungen wurde die Homogentisinsäuremenge ermittelt, die 1 ccm n/10 Natriumthiosulfat entspricht.

Zur Ausführung dieser Bestimmungen wurde eine genau abgewogene Menge reiner Homogentisinsäure in 10 ccm Aqua dest. gelöst, mit Natriumbicarbonat (1 bis 4) oder Borax (5) bis zur alkalischen Reaktion versetzt und unter Zusatz von 1% Stärkelösung mit n/10 Jod bis zur bestehenden Blaufärbung titriert. Dann wurde mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und das ausgeschiedene Jod mit n/10 Natriumthiosulfat zurücktitriert. Die verwendete Homogentisinsäure war zuerst aus Wasser, dann nach längerem Stehen über Schwefelsäure aus absolutem Äther-Petroläther umkristallisiert worden. Sie zeigte den Fp. 147° und war von rein weißer Farbe.

Nr.	Hom., wasserfrei vom Fp. 147°	n/10 Jod	n/10 Natriumthiosulfat	
			ber.	gef.
1	0,1000 g	11,9 ccm	11,905 ccm	11,78 ccm = 99 % der Theorie
2	0,1000 g	12,15 „	11,905 „	11,77 „ = 98,9 % „ „
3	0,0568 g	6,9 „	6,76 „	6,68 „ = 98,8 % „ „
4	0,1000 g	12,17 „	11,905 „	11,81 „ = 99,3 % „ „
5	0,0673 g	8,0 „	8,01 „	7,93 „ = 99,0 % „ „

1 ccm n/10 Natriumthiosulfat entspricht 0,008487 g wasserfreier Homogentisinsäure.

0,1 g Hom. entspricht 11,783 ccm n/10 Natriumthiosulfat.

[1] Amer. Soc. **95** (2), 1825. 1909.

[2] Chem. Ber. **43**, 715, 1910.

Schwieriger war die Frage zu lösen, ob diese einfache Methode auch auf Alkaptonharn übertragbar sei. Es zeigte sich nämlich, daß jeder Harn, bicarbonatalkalisch oder boraxalkalisch gemacht, verschiedene Mengen n/10 Jodlösung verbraucht. Der Prozeß ist jedoch in saurer Lösung nicht reziprok, denn durch Ansäuern wird das verbrauchte Jod nicht wieder in Freiheit gesetzt.

Dies bewiesen Leerversuche mit verschiedenen Harnen.

Harn	n/10 Jod bicarbonatalkalische Lösung ccm	n/10 Natriumthiosulfat, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert
10 ccm L.	0,5	Erster Tropfen entfärbt
10 „ W.	1,3	„ „ „
10 „ K.	1,5	„ „ „
10 „ L.	1,1	„ „ „
10 „ M.	0,35	„ „ „

Eine Fehlerquelle entsteht also hierdurch nicht, da zur Berechnung der Homogentisinsäure der Verbrauch an Kubikzentimeter n/10 Natriumthiosulfatlösung zugrunde gelegt wird.

Um die Brauchbarkeit der Methode zu prüfen, wurde in verschiedenen Harnen eine abgewogene Menge wasserfreier Homogentisinsäure vom Fp. 147° gelöst und darin jodometrisch bestimmt.

Harn	Hom., eingewogen g	n/10 Jod ccm	n/10 $Na_2S_2O_3$ ccm	Gef. Hom. g
10 ccm M.	0,0500	6,2	5,5	0,0501
10 „ S.	0,0500	6,9	5,5	0,0501
10 „ S.	0,0250	3,7	2,75	0,0250
10 „ S.	0,0127	2,2	1,4	0,0127
10 „ Sch.	0,0100	3,0	1,1	0,0100

Die Brauchbarkeit der Methode zur Bestimmung der Homogentisinsäure im Alkaptonharn wurde weiter erbracht durch den Vergleich mit der *Baumann*schen Methode.

Harn	*Baumann* 10%iges Ammoniak g Hom.	Jodometrische Bestimmung g Hom.
10,0 ccm E.	0,0227	0,0227
2,0 „ Z.	0,0185	0,0182
2,0 „ Z.	0,0373	0,0379
2,0 „ Z.	0,0282	0,0281
4,0 „ E.	0,0156	0,0155
10,0 „ Sch.	0,0146	0,0146

Hieraus ergibt sich zur Bestimmung der Homogentisinsäure folgende Arbeitsmethode: 1, 2, 5 oder 10 ccm Harn (genau pipettieren) werden mit Aqua dest. auf 10 ccm verdünnt und mit einer Spatelspitze, bei stark sauren Urinen mit mehr, Natriumbicarbonat bzw. Borax bis zur alkalischen Reaktion versetzt. Als Indikator wird 1 ccm 1 %ige Stärkelösung zugefügt. Diese bicarbonatalkalische bzw. boraxalkalische Lösung wird mit n/10 Jodlösung bis zum Umschlagpunkt titriert. Nun säuert man vorsichtig mit verdünnter Schwefelsäure an. Die Schaumbildung bei Verwendung von Natriumbicarbonat kann man durch Zusatz von Alkohol beseitigen. Zweckmäßiger ist es, Borax zu verwenden, weil hierbei keine Kohlensäure beim Ansäuren gebildet wird. Das ausgeschiedene Jod wird mit n/10 Natriumthiosulfatlösung titriert. Die Homogentisinsäure wird berechnet aus der verbrauchten Menge n/10 Natriumthiosulfat. 1 ccm n/10 Natriumthiosulfat entspricht 0,008487 g wasserfreier Homogentisinsäure. 0,1 g wasserfreie Homogentisinsäure entspricht 11,783 ccm n/10 Natriumthiosulfat. Bei stark dunkelgefärbten Harnen ist der Umschlagspunkt nach Blau durch Tüpfeln mit Stärke leichter zu erkennen. Ist der Homogentisinsäuregehalt z. B. bei Stoffwechselversuchen abnorm groß, so empfiehlt es sich, den Harn vorher zu verdünnen.

Synthese von Formaldehyd und Aceton aus Oxyden des Kohlenstoffs und Wasserstoff oder Wasser durch Kontaktsubstanzen.

Von

Th. Sabalitschka und **C. Harnisch.**

(Aus dem pharmazeutischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 8. August 1927.)

Bei der Katalyse von Kohlenmonoxyd- oder Kohlendioxyd-Wasserstoffgemischen, die neuerdings immer mehr an Bedeutung gewinnt, erhält man je nach den benutzten Katalysatoren und den gewählten Versuchsbedingungen hauptsächlich: 1. Methan[1], 2. seine höheren Homologen, die Erdölkohlenwasserstoffe[2], 3. Methylalkohol[3], 4. seine höheren Homologen, vermischt mit anderen sauerstoffhaltigen Verbindungen, das ist das von *F. R. Fischer* als Synthol bezeichnete Gemisch[4]. Die beiden ersten Produkte entstehen bei gewöhnlichem Druck, die beiden letzteren bei Hochdruck. Sowohl *F. Fischer* und

---

[1] *Sabatier* und *Senderens*, C. r. **134**, 514, 1902; „Die Katalyse", S. 114, Leipzig 1927; *F. Fischer*, *H. Tropsch* und *P. Dilthey*, Brennstoffchemie **6**, 265, Chem. Centralbl. **1926**, I, 9; Die Naturwissenschaften **13**, 1067, 1925.

[2] *F. Fischer* und *H. Tropsch*, Ber. **59**, 830, 832, 923, 1926; **60**, 1330, 1927; Brennstoffchemie **7**, 97, 299, 1926.

[3] *Badische Anilin- und Sodafabrik*, Chem.-Ztg. **49**, 463, 1926; *Dieselbe*, Erfinder *A. Mittasch*, *M. Pier* und *K. Winkler*, D. R.-P. Nr. 415686; Chem. Centralbl. **1925**, II, 1802; *G. Patart*, C. r. **179**, 1330; Chem. Centralbl. **1925**, I, 636; Chimie et Industrie **13**, 179; Chem. Centralbl. **1925**, II, 608; F. P. 540543; Chem. Centralbl. **1923**, II, 631; Chem.-Ztg. **40**, 564, 1925.

[4] *F. Fischer* und *H. Tropsch*, Ber. **56**, 2428, 1923; Brennstoffchemie **4**, 276; **5**, 201; Chem. Centralbl. **1924**, I, 1927; **1925**, I, 1544; Chem.-Ztg. **48**, 563, 1924; *Badische Anilin- und Sodafabrik*, D. R.-P. Nr. 293787, 295202, 295203; *F. Fischer*, „Die Umwandlung der Kohle in Öle", S. 276, 279, 280, Berlin 1924; *Derselbe*, Zeitschr. f. angew. Chem. **40**, 802, 1927.

H. Tropsch[1], wie *A. Mittasch*[2] nehmen als erstes Reaktionsprodukt zwischen den Kohlenoxyden und Wasserstoff unter Druck Formaldehyd an, wenn er sich auch bisher nicht nachweisen ließ; er verschwindet durch Folgereaktionen rasch wieder.

So zeigten *H. Tropsch* und *O. Roelen*[3], daß Formaldehyd an verschiedenen Kontaktsubstanzen zersetzt wird. Sie erhielten z. B. beim Leiten von Formaldehyd über Natriumcarbonat bei 500° Methylformiat; dies erinnert an die schon früher von *C. Mannich* und *Geilmann*[4] gemachte Beobachtung einer Bildung von Methylformiat bei der Einwirkung von Kupfer auf Formaldehyd. Der Zerfall des Formaldehyds kann je nach den Umständen in mannigfaltiger Weise verlaufen. *H. Tropsch* und *O. Roelen* geben folgende Zersetzungsprodukte an: Kohlenoxyd, Kohlendioxyd, Wasserstoff, Methylalkohol, Ameisensäure, Methylformiat, terpentinartig riechende Öle, ungesättigte Kohlenwasserstoffe, Methan und Kohle. Die Zersetzung des bei 400 bis 500° über die Kontaktsubstanzen geleiteten Formaldehyds war häufig vollkommen.

So versprechen Versuche, das Entstehen von Formaldehyd beim Überleiten von Kohlenoxyd- oder Kohlendioxyd-Wasserstoffgemischen über Kontaktsubstanzen nachzuweisen, wenig Erfolg; trotzdem sind sie nicht ganz aussichtslos. Ist doch zu erwarten, daß das Gleichgewicht zwischen Formaldehyd und seinen Aufbausubstanzen und Zersetzungsprodukten für die einzelnen Kontaktsubstanzen verschieden ist, wie auch die Art der Zersetzungsprodukte. Zeigen ja auch die Versuche von *H. Tropsch* und *O. Roelen*, daß die Zersetzung des Formaldehyds nicht nur quantitativ von den Versuchsbedingungen und der Kontaktsubstanz, sondern auch qualitativ von der Kontaktsubstanz abhängt. Für die Möglichkeit, das Entstehen von Formaldehyd nachzuweisen, spricht auch das Ergebnis ähnlicher Versuche von *H. v. Wartenberg*, *A. Muchlinski* und *G. Riedler*[5]. Sie fanden, daß die Entladungen des Ozonrohres zwar beim Durchleiten eines Formaldehyd enthaltenden Wasserstoffstromes den Formaldehyd vollkommen zu Kohlenoxyd und Wasserstoff zerlegen, andererseits aber beim Durchleiten eines Kohlenoxyd-Wasserstoffgemisches durch das Ozonrohr unter denselben Bedingungen Spuren von Formaldehyd entstehen. Tatsächlich sind auch wiederholt Reduktionen von Kohlenoxyd zu Formaldehyd durch Kontaktsubstanzen berichtet oder zum Patent angemeldet; es sei auf die von *A. Jäger*[6] darüber gebrachte Literaturübersicht verwiesen. Stets erhielt man aber nur Spuren von Formaldehyd, und bei einer Nachprüfung durch *A. Jäger* und *H. Winkelmann*[7] erwiesen sich auch diese Angaben zum Teil als unzutreffend. Dagegen gelang es *A. Jäger* und *H. Winkelmann* Kohlenoxyd bis zu ungefähr 1,5% in Formaldehyd überzuführen, wenn sie ein Gemisch von Kohlenoxyd, Wasserstoff und *Wasserdampf* bei Atmosphärendruck durch ein auf 450° erhitztes Quarzrohr

---

[1] Ber. **56**, 2438, 1923.
[2] Ebendaselbst **59**, 30, 1926.
[3] *F. Fischer*, „Ges. Abhandl. zur Kenntnis der Kohle", VII, 15.
[4] Ber. **49**, 585, 1916.
[5] Zeitschr. f. angew. Chem. **37**, 458, 1924.
[6] *F. Fischer*, „Ges. Abhandl. zur Kenntnis der Kohle", VII, 51.
[7] Ebendaselbst 55.



leiteten. Bei Versuchen mit Wassergas unter Druck im kalt-warmen Rohre, in dem sich die flüssigen Reaktionsprodukte sofort ausscheiden, konnten *F. Fischer* und *A. Jäger*[1] ebenfalls die Bildung von Formaldehyd in relativ größeren Mengen feststellen. Auch bei Atmosphärendruck konnten *F. Fischer*, *H. Tropsch* und *P. Dilthey*[2] die Bildung von Formaldehyd neben dem Hauptprodukt Methan im Kohlenoxyd-Wasserstoffgemisch durch einen Nickel-Aluminiumoxyd-Katalysator beobachten.

Durch die Versuchsergebnisse von *G. Klein* und *O. Werner*[3] und von *Th. Sabalitschka*, *H. Riesenberg* und *H. Weidling*[4] dürfte die Richtigkeit der *Baeyer*schen Assimilationshypothese erwiesen sein. Nach dieser Hypothese wird die Kohlensäure in den Pflanzen zu Formaldehyd reduziert, der dann Baustein für die höheren Kohlehydrate ist. Man versuchte schon wiederholt ohne Protoplasma und in Abwesenheit organisierter Materie aus Kohlendioxyd und Wasser Formaldehyd mit Hilfe des Lichtes und verschiedener Kontaktsubstanzen zu erhalten und will dabei Erfolg gehabt haben. Als aber dann *D. Vorländer*[5] die Möglichkeit, Formaldehyd aus Kohlendioxyd im Sonnenlicht und ultravioletten Licht bei Gegenwart von Kontaktsubstanzen zu erhalten, eingehend nachprüfte, konnte er in keinem Falle die Bildung von Formaldehyd beobachten. Dies regte an, auch das Verhalten von Kohlendioxyd und Wasserstoff oder Kohlendioxyd und Wasser bei Gegenwart von Kontaktsubstanzen und höherer Temperatur zu beobachten. *F. Fischer*[6] weist schon auf die Ähnlichkeit des pflanzlichen C-Assimilationprozesses mit der nach seinen Versuchen im Prinzip möglichen Herstellung von Motorbetriebsstoff aus der Kohlensäure der Luft und dem aus Wasser elektrolytisch erhaltenen Wasserstoff hin.

Gemische von CO_2 und H_2, CO_2, H_2 und H_2O, CO_2 und H_2O, ferner von CO und H_2 wurden bei ungefähr 300° und Atmosphärendruck über verschiedene Kontaktsubstanzen geleitet und hierauf auf einen Gehalt an Formaldehyd untersucht. Da auch die Bildung von Aceton unter diesen Bedingungen zu erwarten war, wurde auch darauf geprüft, mitunter auch auf Methylalkohol. Nach der vorher erläuterten leichten Zersetzbarkeit des Formaldehyds durch Kontaktsubstanzen unter den Versuchsbedingungen waren von vornherein nur geringe Formaldehydmengen zu erwarten; es waren daher empfindliche Reagenzien zum

[1] Ber. **56**, 2438, 1923; *F. Fischer*, „Ges. Abhandl. zur Kenntnis der Kohle", VII, 68.
[2] Brennstoffchemie **6**, 267, 1926.
[3] Diese Zeitschr. **168**, 361, 1926.
[4] Ber. d. deutsch. pharmaz. Ges. **32**, 278, 1922; Zeitschr. f. angew. Chem. **35**, 684, 1922; Pharmaz. Monatsh. **4**, 169, 1923; diese Zeitschr. **144**, 545, 551, 1924; **145**, 373, 1924; **148**, 370, 1924; **172**, 45, 1926.
[5] Ber. **58**, 2656, 1925.
[6] Chem.-Ztg. **48**, 564, 1924; Zeitschr. f. angew. Chem. **40**, 803, 1927.

Nachweis zu benutzen, ferner war ihre Brauchbarkeit vorher festzustellen. Über diese Untersuchungen und den Nachweis von Formaldehyd in kleinsten Mengen haben wir bereits berichtet[1]. Vor dem eigentlichen Versuch prüfte man, ob die Kontaktsubstanzen nicht von sich aus infolge eines Gehaltes an Verunreinigungen Formaldehyd oder Aceton unter den Versuchsbedingungen geben. Dies war der Fall bei technischem Calciumcarbid, weißem und rotem Bolus, Koks, Holzkohle, Zuckerkohle u. a. Beim weißen Bolus erhielt man durch Ätherextraktion 0,05 %, beim roten Bolus 0,1 % seines Gewichtes braunes Öl. Auf den Ölgehalt des Tons hat bereits *N. A. Rakusin*[2] hingewiesen. Den bei Zuckerkohle gefundenen Formaldehydgehalt erklärt unsere frühere Beobachtung[3], daß beim Erhitzen von Zucker Formaldehyd entsteht. Enthielten die Kontaktsubstanzen derartige, die Versuche störende Verunreinigungen, so wurden diese entfernt.

In der Tabelle sind die von uns benutzten Kontaktsubstanzen und die jeweils mit den verschiedenen Gasgemischen erhaltenen Ergebnisse berichtet. + bedeutet Spuren von Formaldehyd, ++ bedeutet mehr als Spuren von Formaldehyd, 0 bedeutet Spuren und 00 bedeutet mehr als Spuren von Aceton, — bedeutet ein vollkommen negatives Ergebnis des Nachweises von Formaldehyd oder Aceton. Formaldehyd entstand in nachweisbaren Mengen an den meisten Kontaktsubstanzen, häufig entstand auch Aceton. Ob an den Kontaktsubstanzen, bei welchen der Nachweis nicht gelang, nicht doch unter der Nachweisgrenze liegende Formaldehyd- oder Acetonmengen resultierten oder zwar in größeren Mengen bei der Reaktion entstanden, aber sofort wieder verändert wurden, sei offen gelassen. Die häufig nachweisbare Bildung von Formaldehyd und Aceton in den Gasgemischen an den Kontaktsubstanzen erinnert an den Ausspruch von *A. Mittasch*[4], daß alle jeweils in fester Form vorliegenden Verbindungen an sich Gaskatalysen herbeiführen können, wenn auch jede katalytische Reaktion ihre spezifisch optimalen Katalysatoren hat. Gegenwart von Wasser scheint die resultierenden Formaldehydmengen zu steigern. Dies entspricht den Beobachtungen von *A. Jäger* und *H. Winkelmann*[5] bei Kohlenoxyd-Wasserstoffgemischen. Leiteten diese Forscher ein stark getrocknetes Gemisch durch ein auf 450° erhitztes Rohr, so erhielten sie keinen Formaldehyd, wohl aber bei einem Wassergehalt des Gasgemisches. *A. Jäger* und *H. Winkelmann* erklären die Wirkung des Wasserdampfes in diesem Falle dadurch, daß durch ihn eine zur Re-

---

[1] Pharmaz. Zentralh. 67, 289 ff., 1926.
[2] Chem.-Ztg. 47, 115, 1923.
[3] *Th. Sabalitschka* und *C. Harnisch*, Apotheker-Ztg. 41, 782, 1926.
[4] Ber. 59, 15, 1926; Chem.-Ztg. 49, 988, 1925.
[5] *F. Fischer*, „Ges. Abhandl. zur Kenntnis der Kohle", VII, 58.

duktion notwendige Hydratisierung des Kohlenoxyds erreicht wird. Während hier somit ein Einfluß des Wassers auf die reagierenden Gase angenommen wird, kann man mitunter auch an eine Wirkung des Wassers auf die Kontaktsubstanzen denken, so z. B. beim Aluminiumoxyd; bei diesem erhielten wir Formaldehyd nur bei Gegenwart von Wasser. Nun ist nach *S. Medsforth*[1] und nach *F. Fischer* und *H. Tropsch* und *P. Dilthey*[2] Aluminiumoxyd ein starker Beschleuniger (Promotor) der Methanbildung aus Kohlenoxyd und Wasserstoff bei Gegenwart von Nickel, da es die Wasserabspaltung durch Bindung desselben begünstigt. Auch bei unseren Versuchen kann unter Einfluß des Aluminiumoxydes im trockenen Gasgemisch die Reaktion sofort fast ausschließlich bis zum Methan verlaufen und Formaldehyd sich so nicht mehr fassen lassen, während bei Gegenwart von Wasser die Beschleunigung der Reduktion durch Aluminiumoxyd mehr oder weniger aufgehoben wird, da das Oxyd durch das vorhandene Wasser abgesättigt wird. Die hier bei der Alkalisierung des Gußstahls in beiden Gasgemischen beobachtete Herabsetzung der Formaldehydausbeute steht in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Versuche von *F. Fischer* und *A. Jäger*[3] über die Reduktion des Kohlenoxyds mit Wasserstoff im kalt-warmen Rohr an einer erhitzten Eisenspirale unter Hochdruck; auch dabei verschlechterte ein Bestreichen der Eisenspirale mit Alkali die Ausbeute an Formaldehyd, da das Alkali Kondensationen und Umlagerungen des Formaldehyds bewirkt. Bei alkalisierten Nickelkatalysatoren und gewöhnlichem Druck konnten *H. Tropsch*, *A. Schellenberg* und *A. v. Phillipovisch*[4] eine Entstehung von Formaldehyd überhaupt nicht mehr feststellen. Wenn wir den Gußstahl glühten, erhielten wir dann nachweisbare Formaldehydmengen nicht mehr, mit Schmiedeeisen überhaupt nicht. Bei Graphit trat der Einfluß der Verteilung der Kontaktsubstanz deutlich in Erscheinung, es war nämlich die Bildung von Formaldehyd und Aceton am Graphitpulver stärker als an Graphitstücken.

Nach diesen Versuchen entstehen nachweisbare Mengen von Formaldehyd in Gemischen der Kohlenoxyde mit Wasserstoff oder des Kohlendioxyds mit Wasserdampf bei 300° und Atmosphärendruck an den meisten Kontaktsubstanzen. Bei dieser Synthese von Formaldehyd aus Kohlensäure und Wasser außerhalb des Pflanzenkörpers mit Hilfe von Kontaktsubstanzen war die die pflanzliche C-Assimilation treibende Lichtenergie durch Anwendung höherer Temperatur ersetzt.

---

[1] Journ. Chem. Soc. **123**, 1452, 1923.
[2] Brennstoffchemie **6**, 265, 1925.
[3] *F. Fischer*, „Ges. Abhandl. zur Kenntnis der Kohle", VII, 68.
[4] Ebendaselbst **64**.

Kontaktsubstanz	Gasgemisch			
	$CO_2 + H_2$	$CO_2, H_2 + H_2O$	$CO_2 + H_2O$	$CO + H_2$
Calciumcarbid	++ 0	++ 0	+ —	
Kieselsäureanhydrid	++ —		+ —	
Seesand	++ —		++ —	
Siliciumcarbid	++ 00		++ 0	++ 00
Calciumsilicium	++ 00		+ —	— —
Graphitpulver	++ 0			++ 00
Eisencarbid	— —		+ —	— —
Grauguß	+ 0			+ 0
Gußstahl	++ 00			++ 00
Gußstahl, geglüht	— —			
Schmiedeeisen	— —			— —
Gußstahl mit Alkali	+ —		+ 00	— 00
Baryt	++ —	++ —	+ —	++ —
Natriumhydroxyd	— —		++ —	
Natriumsilikat	+ —		++ 0	
Bimsstein	+ —			
Faserasbest	— —	+ —	+ —	+ —
Kaolin	+ —			
Roter Ton	+ 0			
Koks	+ 0			+ —
Holzkohle	+? —			
Blutkohle	— —		+ 0	++ 00
Eiweißkohle	— —			++ 00
Zuckerkohle	++ —			
Aktive Kohle	+ —			
Calciumcarbonat	+ —		++ 00	+ 00
Bariumcarbonat	+ —		+ —	
Calciumoxyd	+ —			
Bariumoxyd	— —			
Kaliglas	+ 0		++ —	
Natriumchlorid	+ —	++ —	++ —	
Aluminiumoxyd	— —	+ —	+ —	— —
Aluminiumoxyd + Eisenoxyd	+ —			— —
Eisenoxyd	+ 00		++ —	

A. Wasserstoff und Kohlendioxyd.

Apparatur.

Ein 50 cm langes Verbrennungsrohr vom Durchmesser 17 mm liegt in einem 30 cm langen Ofen; im Innern des Rohres befindet sich ein Kupferdrahtgitter an der Stelle, an der das Rohr aus dem Ofen heraustritt; das Gitter ermöglicht das Füllen des Rohres und verhindert ein Mitreißen der Füllung durch den Gasstrom. Die Füllung erstreckt sich von diesem Gitter ab 25 cm gegen die Einströmungsöffnung des Gases, so daß der Teil des erhitzten Rohres (5 cm), in welchen das Gas eintritt, frei von Füllung ist. Das Gas wird aus einem Gasometer oder dem Kippapparat (CO_2) entnommen und vor dem Eintritt in das Rohr in einer Waschflasche mit konzentrierter H_2SO_4 getrocknet (App. A). Um unter Ausschluß von Kohlensäure zu arbeiten, schickte man den aus dem Gasometer kommenden Gasstrom noch durch konzentrierte Kalilauge (App. B). Der aus dem Rohre austretende Gasstrom durchstreicht zwei teilweise mit Wasser (je 30 ccm)

beschickte, von außen mit Eis gekühlte Waschflaschen, in welchen die bei gewöhnlicher Temperatur flüssigen und die im Wasser löslichen Bestandteile des Gasstromes zurückgehalten werden sollen. Man leitet das Gas langsam durch das gefüllte Rohr und erhitzt; ist die gewünschte Temperatur erreicht, so wird der Gasstrom je nach Bedarf beschleunigt oder verlangsamt. Um beim Überleiten von Wasserstoff oder Wasserstoff-Kohlensäuregemisch Sauerstoff möglichst auszuschließen, wird die Apparatur etwas geändert. Zwischen Gasometer und Röhre waren zwei mit Schwefelsäure beschickte Waschflaschen und noch ein Calciumchlorid-Trockenturm eingeschaltet. Der aus den mit Wasser gefüllten Vorlagen austretende Gasstrom wird in einem zweiten Gasometer aufgefangen und von dort wieder in den ersten zurückgeleitet. Zu Beginn schickte man hier aus dem Kipp so lange Kohlensäure durch das gefüllte Rohr, bis die Luft daraus entfernt war; erst dann erhitzte man und leitete nach Abstellen des Kohlensäurestromes das betreffende Gas durch die Röhre (App. C). Um auch Versuche unter Beigabe von Wasserdampf ausführen zu können, ersetzten wir das Glasrohr durch ein entsprechendes Quarzrohr, die aus dem Kipp kommende Kohlensäure passiert vor Eintritt in das Rohr in einem Kolben sich befindendes kochendes Wasser; das Zuleitungsrohr ist so weit in das Quarzrohr eingeführt, daß der nasse Gasstrom unmittelbar auf die erhitzte Füllung trifft. Um eine Abkühlung des aus dem kochenden Wasser kommenden Gasstromes möglichst zu vermeiden, ragt hier das Quarzrohr an der dem Kipp zugekehrten Seite nur wenig aus dem Ofen (App. D). Die Temperatur wurde gemessen durch Anlegen eines Thermometers an das Rohr; nach *Sabatier*[1] ist die im Innern des Rohres bestehende Temperatur 10% höher als die abgelesene; wir fanden die erstere durch Erhöhung der jeweils abgelesenen um 10%. Wenn nicht besonders bemerkt betrug sie ungefähr 300°. Meist wurde das Gas 1 Stunde mit einer Strömungsgeschwindigkeit von ungefähr 45 Liter in der Stunde übergeleitet. Das Rohr ist in der 25 cm langen Schicht möglichst bis oben hin mit der betreffenden Substanz gefüllt. Durch wiederholte Ausführung der Versuche ohne Füllung des Rohres wurde festgestellt, daß nach dem Überleiten der Gase in diesem Falle die mit der Vorlage anzustellenden Reaktionen stets negativ verlaufen.

Zum Nachweis des Formaldehyds benutzten wir folgende Reagenzien:

Phloroglucin-Kalilauge (*Sabalitschka-Riesenberg*) R 2,
Phloroglucin-Salzsäure (*Weber-Tollens*) R 3,
Resorcin-Schwefelsäure (*Cohn*, abgeändert nach *Sabalitschka* und *Harnisch*) R 4,
Guajakol- und Apomorphin-Schwefelsäure (*Pfyl, Reif* und *Hanner*) R 6,
Carbazol-Schwefelsäure (*Gabutti*) R 10,
Benzoylsuperoxyd-Schwefelsäure (*Golodetz*) R 11,
Phenylhydrazinchlorhydrat-Nitroprussidnatrium-Alkali (*Rimini*) R 18,
Fuchsin-schweflige Säure (*Fincke*) R 20.

Wir haben über diese Reaktionen, ihre Empfindlichkeit und Eindeutigkeit bereits eingehend berichtet und möchten darauf verweisen[2]. Die Zahlen beziehen sich auf die dortige Reihenfolge; es seien hier die Reagenzien

---

[1] *Sabatier*, „Die Katalyse", S. 100, Leipzig 1927.
[2] *Th. Sabalitschka* und *C. Harnisch*, Pharmazeut. Zentralh. 67, 289, 1926.



weiterhin nur bezeichnet mit R 2, R 3 usw. R 4 gibt zugleich die Gegenwart von Acetaldehyd zu erkennen. Fiel die sehr empfindliche Probe R 2 nur schwach positiv aus, so stellten wir zum Vergleich auch immer die Probe mit reinem Wasser an.

Zum Nachweis des Acetons bedienten wir uns der Reaktionen von *Lieben* und *Gunning*[1]. Erstere erbringt den Nachweis von noch weniger als 0,0001 mm, letztere gestattet die Unterscheidung des Acetons von Acetaldehyd, Alkohol usw. Die Reaktion nach *Lieben* führten wir in der von *P. Bohrisch*[2] angegebenen Weise aus. Die beiden Reaktionen seien weiterhin mit R-L und R-G bezeichnet.

1. *Calciumcarbid.*

a) Rohes. Aus dem Kipp wird durch App. A CO_2 geleitet und zugleich das in dem Rohre sich befindende Carbid erhitzt; nachdem einige Zeit bei 300° CO_2 weiter übergeleitet war, wechselten wir das vorgelegte Wasser und leiteten hierauf 2 Stunden aus dem Gasometer langsam ein CO_2-H_2-Gemisch (1 : 2 Vol.) über die Füllung. Die erste Vorlage gab folgende Reaktion: R 2 tiefrosa, R 20 violettblau, R 4 rosa Ring, darüber weißer Nebel, R-L nach mehrstündigem Stehen deutlich Jodoformgeruch. Das Wasser der zweiten Vorlage gab keine dieser Reaktionen.

Das während des Durchleitens von CO_2 vorgelegte Wasser gab: R 2 hellrosa, R-L starken Jodoformniederschlag. Da somit das rohe Calciumcarbid beim Erhitzen im Kohlensäurestrom schon für sich Formaldehyd und Aceton abgibt, erhitzten wir 500 g desselben in einer Kupferretorte stark ohne es aber zu glühen. Die entweichenden Dämpfe wurden durch einen Kühler in Wasser geleitet. Während des Erhitzens des Carbids entwickelten sich zuerst bläuliche, dann dichte gelbweiße Nebel, während ein gelbbräunliches Öl überdestillierte; nach 1 Stunde war eine Entwicklung von Dämpfen und Öl nicht mehr bemerkbar, aber die Destillation, wie später sich ergab, noch nicht beendet. Beim Ausäthern des vorgelegten Wassers erhielten wir 0,54 g ölartige Substanz. Die ausgeätherte Lösung gab folgende Reaktion: R 2 rosa, R-L sofortige milchige Trübung, bald Jodoformabscheidung, R-G dasselbe. Bei einer ebenso ausgeführten Destillation des Carbids fanden wir in der Vorlage auch Methylalkohol. Er wurde durch Eintauchen einer glühenden Kupferspirale in die Flüssigkeit in Formaldehyd übergeführt und dieser durch R 2 nachgewiesen; die Färbung war stärker als die mit R 2 direkt erhaltene. Durch einen Vorversuch ist festgestellt, daß ein Tropfen Methylalkohol in 10 ccm Wasser auf diese Weise mit R 2 eine deutliche Rosafärbung gibt. Bei Erhitzen verschiedener Sorten technischen Calciumcarbids war das gegenseitige Mengenverhältnis dieser beobachteten Stoffe ganz verschieden. Es sei noch bemerkt, daß die bei stärkerem Erhitzen auftretenden Dämpfe auch beim Durchleiten durch drei mit Wasser gefüllte, gekühlte Waschflaschen dort nicht zurückgehalten wurden. Wohl verblieben die in Wasser leicht löslichen Destillationsprodukte schon in den ersten beiden Waschflaschen so weit, daß mit dem Wasser der dritten Waschflasche alle Reaktionen negativ verliefen. Formaldehyd gab sich bei R 2 und R 18 (vorübergehende hellblaue Färbung) zu erkennen, und zwar schon beim Erhitzen des Carbids auf 100 bis 150°. Bei einer Sorte Carbid fanden wir nach sehr starkem

---

[1] Zeitschr. f. analyt. Chem. 24, 147, 1885.

[2] Pharmazeut. Zentralh. 48, 181, 1907.



Erhitzen auch Furfurol durch die mit Anilinacetat nach *P. N. van Eck*[1] entstehende hellrosa Färbung.

b) Gereinigtes. Wir glühten das Carbid zur Reinigung eine halbe Stunde vor dem Gebläse und leiteten hierauf in App. A das CO_2-H_2-Gemisch wie oben darüber. Jetzt verliefen die mit dem vorgelegten Wasser ausgeführten Reaktionen alle negativ, und war auch eine Nebel- oder Ölbildung nicht mehr zu beobachten.

Wir versuchten, die störenden Verunreinigungen aus dem Carbid schon bei niedererer Temperatur zu entfernen, indem wir im trockenen Luftstrom so lange erhitzten, bis im vorgelegten Wasser weder Aceton noch Formaldehyd nachweisbar waren; nach dem Erkalten brachten wir das Carbid in die App. A. Dort wurde es nochmals im CO_2-Strom erhitzt und dann nach Wechseln des vorgelegten Wassers im CO_2-H_2-Strom wie oben. Es traten Nebel und Öl nicht auf. Vorlage: R 2 tiefrosa, R 4 rosa Ring, darüber weiße Ausfällung, R 10 hellblau, R-L keine Opaleszenz, erst nach mehrstündigem Stehen deutlicher Jodoformgeruch. Das Calciumcarbid erhitzten wir direkt im Rohre nochmals im trockenen Luftstrom; das dabei vorgelegte Wasser gab keine der Reaktionen. Als wir dann in gleicher Weise wieder CO_2-H_2 darüber leiteten, erhielten wir mit der Vorlage wieder dieselbe Reaktion wie vorher.

Beim Überleiten eines feuchten CO_2-H_2-Stromes über dieses Carbid unter sonst gleichen Bedingungen war die Ausbeute von Formaldehyd etwas größer. Um dieser Beobachtung nachzugehen, leiteten wir über das Carbid so lange trockene Luft bzw. CO_2, bis in dem vorgelegten Wasser weder Formaldehyd noch Aceton nachweisbar waren. Dann wurde ein CO_2-Strom, der vor dem Eintritt in das Rohr fünf mit Eis gekühlte, mit Wasser gefüllte Waschflaschen passiert hatte, über das Carbid geleitet; jetzt erhielten wir nach zweistündigem Durchleiten mit der Vorlage durch R 2 eine hellrosa Färbung.

2. *Kieselsäureanhydrid.*

a) Feines, weißes Pulver, bezogen von *C. A. F. Kahlbaum*, geglüht eine halbe Stunde vor dem Gebläse. Versuche: App. B, trockene, CO_2-freie Luft, Vorlage alle Reaktionen negativ. App. A, trockene CO_2, Vorlage wie vorher. App. C, CO_2-H_2-Gemisch, Vorlage R 2 stark rosa, R-L auch nach zwölfstündigem Stehen der Probe kein Jodoformgeruch. App. D, CO_2-H_2O-Gemisch, Vorlage R 2 hellrosa, R-L —.

b) Feinkörniger Seesand (Warnemünde). Geglüht eine halbe Stunde vor dem Gebläse. App. C, CO_2-H_2-Gemisch, Vorlage R 2 tiefrosa, R 4 rosa Ring, darüber weiße Ausflockung, R-L —. App. D, CO_2-H_2O-Gemisch, Vorlage wie vorher.

c) Eine konzentrierte Natriumsilikatlösung fällten wir mit 10%iger Salzsäure und trockneten den sorgfältig ausgewaschenen Niederschlag bei 130° mehrere Stunden. App. C, CO_2-H_2-Gemisch, beim Erhitzen auf 300 bis 350° zeigte sich, daß die Substanz noch wasserhaltig war, Vorlage R 2 tiefrosa, R 4 roter Ring, weiße Ausflockung, R-L und R-G starke milchige Trübung, bald Jodoformabscheidung. Eine sofortige Wiederholung des Versuchs mit derselben Füllung, die jetzt trocken war, ergab in der Vorlage dieselben Reaktionen etwas schwächer.

---

[1] Pharmaz. Weekbl. **60**, 1204, 1923; Chem. Centralbl. **1924**, I, S. 434; Jahresber. d. Pharmaz. **58**, 137, 1923.



3. *Siliciumcarbid.*

App. A, trockene CO_2, Entstehung schwacher Nebel, Vorlage schwacher, teeriger Geruch. App. C, CO_2-H_2-Gemisch 300 bis 350°, leichte Nebelbildung, Vorlage teeriger Geruch, R 2 kräftig rosa, R 10 hellblau, R 4 hellroter Ring, leichte, weiße Ausflockung, R-L und R-G baldige milchige Trübung und Jodoformgeruch. App. D, CO_2-H_2O-Gemisch, Vorlage R 2 tiefrosa, R 4 rosa Ring, darüber nach 15 Minuten weißer Ring, R-L erst nach einigen Stunden deutlicher Jodoformgeruch.

Die Versuche mit den folgenden Kontaktsubstanzen wurden in analoger Weise ausgeführt; die dabei gemachten Beobachtungen über eine Bildung von Formaldehyd und Aceton zeigt die vorstehende Tabelle; „Spuren von Formaldehyd" (+) bedeutet eine schwache rosa Färbung, „mehr als Spuren" (+ +) eine starke rosa bis tiefrote Färbung bei R 2, „Spuren von Aceton" (0) bedeutet Geruch nach Jodoform, „mehr als Spuren" (00) Trübung oder Niederschlag von Jodoform. Hier seien weiter nur Angaben über die Kontaktsubstanzen, Abänderungen der Versuchsmethodik oder besondere Beobachtungen gemacht.

4. *Calciumsilicium.* 5. *Graphit.*

a) Erbsengroße Stücke. App. C, CO_2-H_2-Gemisch, trocken, leichte Nebelbildung, Vorlage riecht aromatisch, R 2 rosa, R-L —, von 10 ccm der Vorlage wurde 1 ccm abdestilliert, R-L auch mit dem Destillat —.

b) Feines Pulver. App. C, CO_2-H_2-Gemisch, trocken, Vorlage R 2 tiefrosa, R 10 hellblau, R-G leichter Jodoformniederschlag.

6. *Eisencarbid.*

App. A, trockene CO_2, 350 bis 400°, Vorlage enthält Ammoniak, sonst nichts nachweisbar.

7. *Eisen.*

a) Graugußspäne, b) Gußstahlspäne und c) Schmiedeeisenspäne, sämtlich ölfrei. d) Gußstahlspäne wurden mit Kalilauge benetzt, auf dem Wasserbad getrocknet und erhitzt.

8. *Baryt.*

Erbsengroße Bimssteinstückchen wurden geglüht und nach dem Erkalten in Barytlauge 1 Stunde gekocht; nach dem Abgießen der Flüssigkeit wurden sie bei 130° getrocknet.

9. *Natriumhydroxyd.*

Wie unter 8. auf Bimsstein niedergeschlagen.

10. *Natriumsilikat.*

Wie unter 8. auf Bimsstein niedergeschlagen, aber zum endgültigen Trocknen einige Zeit bei 250° im App. A im CO_2-Strom erhitzt.

11. *Bimsstein.*

Erbsengroße Stücke, geglüht.

12. *Faserasbest.*

Geglüht und in CO_2 (App. C) noch einmal erhitzt.



13. Kaolin.

Kaolin wurde in einem Kölbchen erhitzt und die Dämpfe in 15 ccm mit Eis gekühltes Wasser geleitet. Reaktion: Anilinacetat tiefrot (Furfurol), R 2 rosa, R 10 malvengrau mit violettem Unterton, R 6 rot, bald in blauviolett übergehend, R-L reichlicher Jodoformniederschlag, auf dem Wasser ölige, leicht bräunliche Schicht; bei Extraktion des Kaolins mit Äther erhielt man ungefähr 0,05% leicht bräunliches Öl. App. A, Kaolin wurde so lange in trockener CO_2 bei 350° erhitzt, bis in vorgelegtem Wasser Furfurol und Aceton und auch die ölige Substanz nicht mehr nachweisbar waren; jetzt CO_2-H_2-Gemisch.

Weißer Bolus gab dieselben Stoffe in noch größerer Ausbeute beim direkten Erhitzen als oben die pulverförmige Porzellanerde. Roter Bolus lag in zwei Formen vor, nämlich als walnußgroße, weiche, runde Stücke, die sich im Mörser leicht pulvern ließen, und als harte, größere Stücke. Beide Formen verhielten sich beim Erhitzen verschieden. Die harten Stücke wurden grob gepulvert und im Luftstrom erhitzt; dabei entwich Wasser, das sich im kälteren Teile des Rohres kondensierte und in dem durch R 2 eine rosa Farbe, die allmählich in ein haltbares bräunliches Rosa überging, durch R 6 ein erst graugrüner Ring mit violettem Unterton, nachher vollständige violette Färbung, durch Anilinacetat eine intensive Rotfärbung entstand. Diese Stücke wurden so lange in CO_2 erhitzt, bis das Wasser daraus entfernt war und die Vorlage keine Reaktion mehr gab; jetzt CO_2-H_2-Gemisch. Nachweis von CH_3OH wie unter 1 positiv. Die runden Bolusstücke entwickelten beim Erhitzen für sich starke Nebel, gelbgefärbtes Wasser und Öl. Das Wasser, in welchem die entweichenden Dämpfe aufgefangen waren, wurde durch Kohle filtriert und auf das Zehnfache verdünnt. In dem Filtrat waren Furfurol und Aceton in erheblicher Menge nachweisbar. Der erhitzte Bolusrückstand war stark mit Kohle durchsetzt. Bei der Extraktion mit Äther erhielten wir aus diesem roten Bolus ungefähr 0,1% gelbbraunes Öl.

14. Koks.

Der Koks war stark wasserhaltig. Beim Erhitzen im CO_2-, H_2- oder Luftstrom entwickelte er Nebel, und im vorgelegten Wasser fand sich Furfurol und Aceton; es roch teerig. Der Koks wurde kurze Zeit stark geglüht und nach dem Erkalten in erbsengroße Stücke zerschlagen. App. A, trockene CO_2, Vorlage alle Reaktionen —. App. C, CO_2-H_2-Gemisch, Vorlage R 2 rosa, R-L —. Der Versuch wurde wiederholt, wobei aber der Koks nicht geglüht, sondern direkt im Rohre im CO_2-Strom so lange bei 300° erhitzt wurde, bis in der Vorlage Furfurol und Aceton nicht mehr nachweisbar waren; jetzt CO_2-H_2-Gemisch, 400°, Vorlage R 2 rosa, R-L —, aber 2 ccm Destillat von 10 ccm Vorlage gaben Opaleszenz und Jodoformgeruch.

15. Holzkohle.

Es wurde so lange trockene CO_2 übergeleitet, bis Furfurol und Aceton in der Vorlage nicht mehr nachweisbar waren. Die entstehenden Mengen dieser Stoffe waren bei den einzelnen Sorten sehr verschieden; nur geringe Mengen gab z. B. die Holzkohle von *C. A. F. Kahlbaum*, größere Mengen gaben die aus Apotheken bezogenen Proben. Bei ersterer entstanden beim Erhitzen keine Nebel, bei letzteren weiße bis graugelbe Dämpfe. App. C, Holzkohle wurde so lange in trockener CO_2 erhitzt, bis im vorgelegten Wasser die genannten Verunreinigungen nicht mehr nachweisbar waren; jetzt CO_2-H_2-Gemisch.

16. Blutkohle.

Zu den Versuchen diente eine von *C. A. F. Kahlbaum* bezogene Blutkohle und eine selbstbereitete; wir tränkten Bimssteinstückchen mit Rinderblut, erhitzten sie hierauf bis zur Verkohlung und trockneten bei 130°.

17. Eiweißkohle.

Geglühte Bimssteinstückchen kochte man 1½ Stunden in einer Gelatinelösung und trocknete sie; hierauf verkohlte man die aufgenommene Gelatine und trocknete weiter bei 150°.

18. Zuckerkohle.

Die Zuckerkohle war teils bezogen, teils ebenso wie die Eiweißkohle auf Bimsstein niedergeschlagen. Die bezogene Zuckerkohle war wasserhaltig; wurde sie direkt in App. A gebracht und darüber CO_2 geleitet, so gab die Vorlage mit R 2 Rosafärbung, R 10 hellblaue Färbung und R-L intensiven Jodoformgeruch; nach mehrstündigem Trocknen bei 130° gab die Kohle unter den gleichen Bedingungen diese Reaktionen in der Vorlage nicht mehr. App. C, CO_2, alle Reaktionen —; CO_2-H_2-Gemisch, Vorlage R 2 tiefrosa, R 20 rotviolett, R 10 hellblau, R-L —; die von uns auf Bimsstein niedergeschlagene Kohle gab bei demselben Versuch in der Vorlage keine Reaktionen.

19. Aktive Kohle.

Sie gab beim Erhitzen im trockenen CO_2-Strom Furfurol und Aceton und war stark wasserhaltig. App. C, so lange CO_2, bis Vorlage alle Reaktionen —; dann CO_2-H_2-Gemisch.

20. Calciumcarbonat.

Calciumcarbonatpulver und Marmorstückchen verhielten sich ziemlich gleichartig.

21. Bariumcarbonat.

a) App. A, roher Witherit, trockene CO_2, Vorlage R-L und R-G Jodoformtrübung. Daher wurde der Witherit stark geglüht. App. C, trockene CO_2, Vorlage alle Reaktionen jetzt —; weiter CO_2-H_2-Gemisch. b) Reines Bariumcarbonat.

22. Calciumoxyd. 23. Bariumoxyd. 24. Kaliglasscherben. 25. Natriumchlorid.

Geglühte Bimssteinstückchen wurden längere Zeit mit konzentrierter NaCl-Lösung gekocht und dann getrocknet. App. B, CO_2-freie Luft bis zur Entfernung des noch anhaftenden Wassers, dann App. C, CO_2-H_2-Gemisch.

26. Aluminiumoxyd.

a) Reines. b) Schmirgel. Die graubraunen, harten Stücke wurden klein geschlagen. App. A, trockene, CO_2-freie Luft, Vorlage Anilinacetatrot (Furfurol), R 2 rosa mit bräunlicher Nuance, R 10 tief violettblau, R-L und R-G starker Jodoformniederschlag; daher wurde der Schmirgel stark geglüht und jetzt gegeben in App. C, CO_2-H_2-Gemisch, Vorlage R 2 rosa bis tiefrosa, je nach der Versuchsdauer (1 bis 4 Stunden), R-L —. App. D, CO_2-H_2O-Gemisch, stärkere Formaldehydreaktionen als vorher, Aceton —.



27. Aluminiumoxyd und Eisenoxyd.

Das Gemisch, sorgfältig getrocknet, verhielt sich wie der Schmirgel.

28. Eisenoxyd.

B. Wasserstoff und Kohlenoxyd.

Diese Versuche wurden nur in App. C, und zwar unter folgenden Bedingungen ausgeführt: 350 bis 400°; Gasgemisch CO und H zu gleichen Teilen; Gasstrom etwa 45 Liter in der Stunde; CO kam vom Gasometer, H wurde im Kipp entwickelt; zu Beginn der Versuche wird ohne Erhitzen so lange CO_2 durch die Apparatur geleitet, bis die Luft daraus verdrängt ist, hierauf der CO-H_2-Strom eingeschaltet und gleichzeitig rasch erhitzt; der CO-H_2-Strom passierte zur Beseitigung etwa vorhandener CO_2 40%ige Kalilauge.

1. Siliciumcarbid.

Schichtlänge 17 cm, Versuchsdauer 1 Stunde, Vorlage R 2 —, R-L —; Versuchsdauer 2 Stunden, Vorlage R 2 rosa, R-L —; Schichtlänge 30 cm, Versuchsdauer 1 Stunde, Vorlage R 2 tiefrosa, R 4 roter Ring mit weißer Ausflockung, R-L Jodoformtrübung.

2. Calciumsilicium.

3. Graphitstaub.

Mit Graphitstaub gepuderte Bimssteinstückchen, Schichtlänge 25 cm, Versuchsdauer 1 Stunde, Vorlage R 2 rosa, R 4 hellroter Ring, darüber weiße Ausflockung, R-L starke Jodoformtrübung. Graphit ohne Bimssteinstücke, Schichtlänge 25 cm, Versuchsdauer 1 Stunde, Vorlage R 2 intensiv rosa, R 10 hellblau, R 18 bald vorübergehende Blaufärbung, R-L und R-G Jodoformniederschlag.

4. Eisencarbid, 5. Koks, 6. Blutkohle, 7. Eiweißkohle, 8. Calciumcarbonat, 9. Faserasbest, 10. Eisen, 11. Baryt, 12. Aluminiumoxyd, 13. Aluminiumoxyd + Eisenoxyd

entsprechen den unter A benutzten Kontaktsubstanzen. Das Gasgemisch wurde stets 1 Stunde übergeleitet.

Über einige Anhydride der Aminosäuren aus Gelatine (Hydrolyse nach der Methode von Zelinsky-Ssadikow).

Von

N. Gawrilow und K. Lawrowsky.

(Aus dem Laboratorium für organische Chemie der I. Universität in Moskau.)

(Eingegangen am 12. September 1927.)

Nachdem *Zelinsky* und *Ssadikow* (1) eine Methode zur Hydrolyse der Proteine beschrieben hatten, die die Isolierung einer Anzahl von Anhydriden der Aminosäuren ermöglichte, wurde die Frage nach der Möglichkeit der Präexistenz von Anhydridgruppierungen im Eiweißmolekül in der Literatur erörtert (2). Eine ganze Reihe Untersuchungen verschiedener Autoren hat nach unserer Meinung mit sehr viel Wahrscheinlichkeit gezeigt, daß die Auffassung von *Zelinsky*, *Ssadikow*, *Herzog*, *Brigl* und *Abderhalden* [der sich etwas später der Theorie der Anhydridstruktur der Proteine auch anschloß (3)] auf reeller Basis aufgebaut ist. Immerhin war es für uns von Bedeutung, diese Methode auch zur Untersuchung der so gut bekannten Gelatine anzuwenden, denn schon 1906 (5) wurden unter deren Spaltungsprodukten durch Trypsin Anhydride gefunden. Diese Anhydride waren optisch aktiv; falls man mit der Methode von *Zelinsky-Ssadikow* ebenfalls optisch aktive Anhydride isolieren könnte, wäre die Frage, ob die bei der Autoklavenhydrolyse auftretenden Anhydride im Eiweiß vorgebildet seien, positiv entschieden. Es ist uns wirklich gelungen, l-Prolilglycinanhydrid in optisch aktiver Form zu isolieren. Dieses Anhydrid erwies sich mit dem von *Levene* und *Beatty* dargestellten als identisch. Außerdem gelang es uns auch, l-Leucinglycinanhydrid zu isolieren und seine Struktur nachzuweisen. Bei der Extraktion des Hydrolysats mit Essigäther werden augenscheinlich auch andere Anhydride extrahiert, die sich indessen durch vielstündiges Kochen mit Essigäther oder sogar bei bloßer Umkristallisation in die entsprechenden Aminosäuren spalten. Wir untersuchten diese sekundär hydrolysierten Spaltungsprodukte

bereits isolierter Anhydride; sie erwiesen sich als ein Gemisch von Aminosäuren, Glykokoll und Leucin. Die Anwesenheit von Prolin konnte nur durch die Fichtenspanreaktion nachgewiesen werden, denn der Prolinester ist, wie bekannt, durch fraktionierte Destillation vom Leucinester sehr schwer zu trennen.

Die erstere durch Essigäther ausgezogene Fraktion bestand demnach hauptsächlich aus zwei Anhydriden, l-Prolilglycinanhydrid und l-Leucinglycinanhydrid. Diese Fraktion macht ungefähr 10 % der hydrolysierten Gelatine aus.

Es werden also bei der Eiweißhydrolyse nach *Zelinsky-Ssadikow* als Reaktionsprodukte Anhydride gewonnen, die identisch sind mit den Reaktionsprodukten der tryptischen Verdauung, welche nach allen bisherigen Untersuchungen noch niemals die Bildung von Diketopiperazinen infolge einer sekundären Reaktion verursacht hat. Die mit *Fränkels* Anhydridase (4) erhaltenen Anhydride sind sicherlich keine Diketopiperazine.

Es muß hier auch bemerkt sein, daß die Veränderung in der Methode von *Zelinsky-Ssadikow*, welche *Abderhalden* verlangt, nämlich die Extraktion nicht aus der Lösung, sondern aus dem trockenen Hydrolysat im *Soxhlet*schen Apparat, unzweckmäßig ist. Unsere Erfahrung hat gezeigt, daß auf diese Weise die Extraktion länger dauert und viel weniger Produkte erhalten werden, als wenn die Lösung in *Maassans* Extraktor extrahiert wird, wie es die oben erwähnten Autoren gemacht haben.

Obwohl wir das Hydrolysat und den Essigäther fortwährend auf neutrale Reaktion prüften, begann schon im Extraktor die Hydrolyse der ausgezogenen Anhydride. Darum ist es ratsam, bei monatelanger Extraktion die extrahierte Lösung täglich durch frischen Essigäther zu ersetzen. Solch ein Ersatz wird höchstwahrscheinlich die Anhydride vor weiterer Hydrolyse schützen.

Aus den Bestimmungen des Ammoniaks und des Aminostickstoffs ist es ersichtlich, daß das Verhältnis von Amino- zu Gesamtstickstoff sich nach der Extraktion vergrößert hat.

	% von Amino- und Ammoniakstickstoff zu Gesamt-N	% NH_3	Verhältnis von Aminostickstoff zu Gesamt-N
Vor der Extraktion . . .	30,6	4,8	25,8
Nach der Extraktion . .	33,5	0,45	33,05

Diese Veränderung stimmt mit der Extraktion von 10 % des mit Formol nicht titrierbaren Stickstoffs aus den Anhydriden des Hydrolysats überein.

Experimenteller Teil.

500 g Gelatine wurden in 5 Liter 1,5 %iger Schwefelsäure gelöst und im Autoklaven bei 180° und 10 Atmosphären Druck 3 Stunden erhitzt. Das erhaltene Hydrolysat ist orange gefärbt. Die Biuretreaktion ist negativ, mit Ninhydrin und mit Pikrinsäure und Soda gibt es positive Reaktion. Die Lösung wurde mit $Ba(OH)_2$, zuletzt mit $BaCO_3$ neutralisiert. Im Hydrolysat wurden der Gesamtstickstoff nach *Kjeldahl*, der Aminostickstoff nach *Sörensen* und das Ammoniak durch Abdestillieren über MgO bestimmt.

Es wurden in Prozenten von Gesamtstickstoff gefunden: Aminostickstoff nach *Sörensen* 30,6 % (NH_3-Stickstoff inbegriffen), Ammoniakstickstoff 4,8 %.

Das neutralisierte Hydrolysat wurde auf dem Wasserbade bei 40° und 10 bis 11 mm Druck konzentriert. Nach abermaligem Abdestillieren mit absolutem Alkohol wurde es im Vakuumtrockenapparat bei 45° und 10 mm getrocknet.

Extraktion mit Essigäther.

Die Extraktion mit Essigäther wurde gleichzeitig in zwei Apparaten vorgenommen, im Extraktor von *Soxhlet* (trockenes Pulver) und in *Maassans* Extraktor für Flüssigkeiten (wässerige Lösung des Hydrolysats). Beide Apparate arbeiteten 4 Tage. Es wurde konstatiert, daß die Extraktion aus wässeriger Lösung schneller vor sich geht und der Extrakt heller ist als im Extraktor von *Soxhlet*, dessen Hülse mit Leim verschmiert wird, was die Extraktion sehr verlangsamt. Deswegen wurde das trockene Hydrolysat wieder in Wasser gelöst und in den Apparat für Extraktion von Flüssigkeiten übergeführt. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Extraktion aus wässeriger Lösung unvergleichlich bequemer ist: Sie führt rascher zum Ziel, die Vorbereitung des Stoffes zur Extraktion beansprucht weniger Zeit und läßt weniger als beim mehrmaligen Trocknen irgendwelche Veränderungen im Stoff befürchten. Die Extraktion mit Essigäther wurde 20 Tage fortgesetzt, die Apparate arbeiteten Tag und Nacht.

Es wurden aus dem Hydrolysat durch Essigäther 50 g kristallinischer und 40 g unkristallisierter Substanz ausgezogen. Die kristallinische Substanz gibt mit Pikrinsäure und Soda positive Reaktion, desgleichen mit Ninhydrin. Diese letzte Reaktion wurde erst am Ende der Extraktion festgestellt. Die ersten Portionen der kristallinischen Substanz gaben keine Ninhydrinreaktion. Auch ging am Ende der Extraktion das nichtkristallisierende Öl in viel größerer Menge als im Anfang über. Ganz zuletzt gingen in den Essigäther schwer lösliche Kristalle über, die sich ohne jegliche Konzentrierung des Äthers ausschieden, während die ersten Portionen des Extraktes erst nach starkem Einengen kristalli-

sierten. Auch nach dem Aussehen unterschieden sich die ersten und letzten Kristallportionen sehr bedeutend. Die letzte Portion gab stärkere Reaktion auf freie Aminosäuren, sie wurde in sehr kleiner Menge erhalten.

Untersuchung der kristallinischen Substanz des Essigätherextrakts.

50 g der kristallinischen Substanz (10 % der genommenen Gelatine) wurden aus Essigäther umkristallisiert. Zur Lösung von 20 g Kristallen braucht man 1 Liter kochenden Essigäthers. Die umkristallisierte Substanz gibt keine Ninhydrinreaktion mehr.

Es hinterblieb nach der Kristallisation aus Essigäther recht viel Öl, das starke Reaktion auf Aminosäuren gab: augenscheinlich werden die Anhydride dabei bedeutend zerstört. Das erhaltene Anhydrid wurde aus Isoamylalkohol umkristallisiert. Die Hauptfraktion schmilzt bei 182°, die Fraktion aus der Mutterlauge bei 155 bis 156°. Die Hauptfraktion wurde noch einmal aus Isoamylalkohol umkristallisiert. Nach geringem Einengen und Zusatz von Äthyläther wurde eine Fraktion gewonnen, die bei 180° sintert und bei 188° schmilzt. Beide Mutterlaugen wurden vereinigt, denn die Schmelzpunkte der sich ausscheidenden Kristalle erwiesen sich als sehr naheliegend (155 und 158 bis 159°). Die Fraktion mit Schmelzpunkt 188° wurden zum drittenmal aus Isoamylalkohol umkristallisiert. Nach Einengen im Vakuum und Zusatz von viel Äthyläther fielen reine farblose Kristalle aus. Sie wurden mit Äther gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet. Der Schmelzpunkt blieb unverändert, 188° (korrigiert).

Untersuchung der Fraktion mit Schmelzpunkt 188°.

Die Verbindung ist leicht löslich in Wasser, Äthyl- und Methylalkohol, in großen Mengen Essigäther, unlöslich in Äther, Chloroform und Aceton, schmeckt bitter, gibt positive Reaktion mit Pikrinsäure und Soda und keine Reaktion auf freie Aminosäuren. Sie ist optisch aktiv, linksdrehend, $(\alpha) = -9{,}2^0$ in 1 %iger wässeriger Lösung. Fichtenspanreaktion positiv.

Mikroanalyse nach *Pregl*:

3,887 mg	Substanz geben	7,748 mg	CO_2	54,35 %	C
3,887 „	„ „	2,427 „	H_2O	6,98 %	H
3,765 „	„ „	7,507 „	CO_2	54,38 %	C
3,765 „	„ „	2,360 „	H_2O	7,00 %	H

Gesamtstickstoff nach *Kjeldahl*:

0,1559 g Substanz enthalten 0,02729 g N 17,89 % N

Für $C_7H_{10}N_2O_2$: Ber.: 54,51 % C, 6,54 % H, 18,18 % N;
Gef.: 54,35 % C, 6,98 % H, 17,89 % N.

Der Analyse nach kann man für die erhaltene Verbindung die Struktur des Glycinprolinanhydrids annehmen:

```
           CO    CH2
         N/‾‾‾‾‾‾‾‾\NH
     H2C/ \________/
        |  |CH* CO
     H2C———CH2
```

Zur Bestätigung dieser Annahme wurde das Anhydrid bis auf Aminosäuren gespalten und die entstandenen Spaltungsprodukte untersucht.

Spaltung des Prolilglycinanhydrids.

1 g Anhydrid in 10 ccm 10 %iger H_2SO_4 wurde 4 Stunden lang bei 150⁰ und 4 Atmosphären Druck im Autoklaven hydrolysiert. Alles löste sich auf. Das Hydrolysat wurde erst mit $Ba(OH)_2$, dann mit $BaCO_3$ neutralisiert. Die Lösung schmeckt süß und gibt keine Reaktion mit Pikrinsäure und Soda. Nach Eindampfen bis zur Trockne auf dem Wasserbade bei 40⁰ und 10 mm Druck wurde absoluter Alkohol zugesetzt und nochmals in derselben Weise eingedampft. Sodann wurde der Rest mit absolutem Äthylalkohol bis zum Verschwinden der Pyrrolreaktion extrahiert.

Untersuchung der in absolutem Alkohol unlöslichen Fraktion des Hydrolysats.

Der ungelöste Rest wurde mit 50 ccm Alkohol versetzt und die Aminosäure in üblicher Weise verestert. Das Reaktionsprodukt wurde im Vakuum auf zwei Drittel des Volumens konzentriert und noch einmal verestert. Beim Stehen in der Kälte schied sich das Chlorhydrat des Esters aus; es wurde abfiltriert, mit absolutem Alkohol gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet, schmilzt bei 143 bis 144⁰.

3,385 mg Substanz geben 4,258 mg CO_2 34,33 % C
3,385 „ „ „ 1,355 „ H_2O 4,47 % H

Für $C_4H_9NO_2HCl$: Ber.: 34,4 % C, 4,46 % H;
Gef.: 34,35 % C, 4,47 % H.

Untersuchung der in absolutem Alkohol löslichen Fraktion des Hydrolysats.

Die alkoholische Lösung wurde im Vakuum bei 10 mm Druck getrocknet, der trockene Rest wieder in Alkohol gelöst und eingedampft. Nach Abkühlen bildete sich ein kristallinischer Niederschlag von süßem Geschmack. Pyrrolreaktion positiv. Nach Umkristallisieren aus absolutem Alkohol und Trocknen im Vakuumexsikkator schmilzt er bei 220 bis 221⁰ und sintert schon bei 212 bis 215⁰.

Stickstoff nach *Kjeldahl*:
0,1310 g Substanz enthalten 0,0163 g N 12,46 % N

Für Prolin: Ber.: 12,17 % N;
Gef.: 12,46 % N.

Ein Teil des Niederschlags wurde zur Herstellung des Prolinpikrats verwendet.

Die Fraktion mit Schmelzpunkt 188° besteht also aus l-Prolilglycin-anhydrid. Alle physikalischen und chemischen Eigenschaften der erhaltenen Verbindung sind mit denen des synthetischen Prolilglycin-anhydrids identisch. Nur der Schmelzpunkt des isolierten Produktes 188° ist niedriger als der des synthetischen (211°). Ein ähnliches Produkt wurde von *Levene* und *Beatty* bei tryptischer Verdauung von Gelatine isoliert. Der Schmelzpunkt war noch etwas niedriger (182 bis 183°).

Untersuchung des bei der Essigätherextraktion erhaltenen Öles.

Das Öl wurde mehrmals mit kochendem Essigäther behandelt. Das erhaltene Produkt gibt keine Reaktion auf Anhydride und enthält augenscheinlich nur freie Aminosäuren. Fichtenspan- und Ninhydrinreaktion positiv.

Das Öl wurde mit absolutem Alkohol versetzt und mit trockenem Salzsäuregas übersättigt; nach Einengen wurde die Esterifizierung wiederholt. Nach zweitägigem Stehen in der Kälte bildete sich im bis auf ein Drittel des Volumens konzentrierten Reaktionsprodukt kein Niederschlag. Die freien Ester der Aminosäuren wurden darauf aus dem Estergemisch isoliert. Es wurden bei fraktionierter Destillation folgende Fraktionen erhalten.

Bei 10 bis 12 mm Druck und 50 bis 65° . . . etwa 20 g,
„ 10 „ 12 „ „ „ 65 „ 86° . . . „ 20 g.

Die Fraktion mit Kp. 50 bis 65° wurde im zugeschmolzenen Rohr erhitzt. Beim Abkühlen schieden sich farblose Kristalle aus, die abfiltriert und mit absolutem Äther gewaschen wurden.

Sie sintern bei 245° und schmelzen bei 274°. Der Schmelzpunkt erweist sich als der des Diketopiperazins.

3,785 mg enthalten 5,837 mg CO_2 42,06% C,
3,785 „ „ 1,732 „ H_2O 5,11% H.

Für Diketopiperazin theoretisch 42,08 % C, 5,3 % H. Die bei 65 bis 86° übergehende Fraktion gibt ausgeprägte Pyrrolreaktion. Nach Erhitzen im zugeschmolzenen Rohr bildeten sich Kristalle. Der Niederschlag wurde sogleich abfiltriert und mit absolutem Äthyläther bis zum völligen Verschwinden der Pyrrolreaktion gewaschen. Der Schmelzpunkt (270 bis 271° mit starker Zersetzung) entspricht dem l-Leucinimid.

3,706 mg enthalten 8,641 mg CO_2 63,58% C,
3,706 „ „ 3,247 „ H_2O 9,79% H.

Für Leucinimid theoretisch berechnet 63,69 % C, 9,8 % H. Es gelang nicht, Prolin zu isolieren, aber die stark positive Fichtenspan-

reaktion im Filtrat des Leucinimids und in der Lösung des Esters vor der Anhydridbildung läßt auf die Anwesenheit von Prolin im untersuchten Öl schließen.

Das Öl bestand also aus drei freien Aminosäuren: Glycin, Leucin und Prolin. Keine von diesen Aminosäuren ist in Essigäther löslich, und darum muß man daraus schließen, daß diese Aminosäuren durch Spaltung der durch Essigäther extrahierten Anhydride entstanden sind.

Untersuchung der in Essigäther schwer löslichen Kristallfraktion.

10 g Substanz wurden aus Essigäther umkristallisiert. Nach zweimaliger Umkristallisation gab der Niederschlag nur noch Anhydridreaktion. Bei fraktionierter Kristallisation aus Amylalkohol wurden zwei Fraktionen gewonnen, mit Schmelzpunkt 180 bis 185° und 195 bis 199°.

Mikroanalyse der Fraktion mit Schmelzpunkt 195 bis 199°:

0,916 mg Substanz geben 5,981 mg CO_2 55,94% C,
0,916 „ „ „ 2,271 „ H_2O 8,71% H.

Stickstoff nach *Kjeldahl*:

0,10875 g Substanz enthalten 0,018208 g N 16,81% N.

Für die Verbindung $C_8H_{14}N_2O_2$: Ber.: 56,43% C, 8,29% H, 16,47% N,
Gef.: 55,94% C, 8,71% H, 16,81% N.

Nach der Elementaranalyse liegt augenscheinlich Leucinglycinanhydrid vor.

Hydrolyse des Anhydrids.

1 g Substanz wurde im Autoklaven mit 10%iger H_2SO_4 hydrolysiert. Nach 2 Tagen schied sich das Chlorhydrat des Esters ab. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit absolutem Äther gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet, Schmelzpunkt 143 bis 144°. Im untersuchten Anhydrid war also Glykokoll vorhanden.

Das Filtrat von dem Chlorhydrat des Glykokollesters wurde zum zweitenmal verestert; es bildete sich selbst bei langem Stehen kein Niederschlag. Aus dem Reaktionsprodukt wurden dann die Ester in freiem Zustande erhalten und die bei 70 bis 85° und 10 mm Druck übergegangene Fraktion im zugeschmolzenen Rohr erhitzt. Nach dem Erkalten bildete sich ein Niederschlag, der abfiltriert, mit absolutem Äther gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet wurde, Schmelzpunkt 268 bis 270°, was dem Leucinimid entspricht. Die Menge des erhaltenen Niederschlags war für eine Analyse zu gering. Dennoch kann man das untersuchte Produkt als Glycil-Leucinanhydrid ansehen. Einige Zweifel erweckt nur der Schmelzpunkt, der niedriger als beim analogen, aus Elastin isolierten Anhydrid liegt.

Da die Fraktion mit Schmelzpunkt 180 bis 185° in sehr geringer Menge erhalten war und bei wiederholter Umkristallisation keinen beständigen Schmelzpunkt gab, wurde sie nicht weiter untersucht. Es war kein einheitliches Produkt, sondern ein Gemisch verschiedener Verbindungen.

Chloroformextraktion.

Bei der Extraktion des Hydrolysats mit Chloroform ging im Laufe von 120 Stunden nichts in den Extrakt über.

Auch durch Äthyläther konnte nichts extrahiert werden.

Nach Beendigung der Extraktion wurde im Hydrolysat das Verhältnis zwischen Gesamt-, Amino- und Ammoniakstickstoff bestimmt.

Gefunden in Prozenten des Gesamtstickstoffs:

Aminostickstoff nach *Sörensen* . . . . 33,5 %,
Ammoniakstickstoff . . . . 0,45 %.

Literatur.

1) *Ssadikow* und *Zelinsky*, diese Zeitschr. **147**, 30, 1924; **136**, 241, 1923. — 2) *Abderhalden* und *Suzuki*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **127**, 281, 1923; *Abderhalden*, *Klarmann* und *Komm*, ebendaselbst **140**, 92, 1924; *Abderhalden* und *Komm*, ebendaselbst **139**, 181, 1924; *Abderhalden* und *Stik*, ebendaselbst **132**, 238, 1923; *Brill*, Liebigs Ann. **434**, 204, 1923; *Herzog*, Zeitschr. f. angew. Chem. **35**, 1922; *Bergmann*, Die Naturwissenschaften **12**, 1158, 1165, 1924. — 3) *Abderhalden*, *Klarmann* und *Schwab*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **135**, 180, 1924. — 4) *Fränkel* u. a., diese Zeitschr. **120**, 218, 1921; **130**, 592, 1922; **134**, 308, 1923; **145**, 225, 1924. — 5) *Levene* und *Beatty*, Berl. Ber. **39**, 2060, 1906.

Studien über Fett- und Lipoidstoffwechsel.

VI. Mitteilung:

Über die Rolle der Lungen im Fett- und Lipoidstoffwechsel.

Von

S. Leites.

[Aus dem Laboratorium für pathologische Physiologie des Medizinischen Instituts zu Charkow (Ukraine).]

(Eingegangen am 6. September 1927.)

I. Einleitung.

Seit den klassischen Untersuchungen von *Munk*, *Pflüger*, *Minkowski* und anderen nimmt man an, daß die Hauptmenge des Nahrungsfettes aus dem Darm in die Lymphgefäße und dann weiter in den Ductus thoracicus eintritt, wobei es teils in der Darmwand resynthetisiert wird, teils als Spaltprodukt — Fettsäuren bzw. Seifen — auftritt. In ähnlicher Weise verläuft die Resorption des Cholesterins und der Phosphatide bzw. deren Spaltungsprodukte (*H. Müller*, *S. Fränkel*, *Slowtzow*). Im Zusammenhang mit dieser Resorption erscheinen die Lungen als das erste Organ, welches das Fett und die Lipoide bzw. deren Bestandteile passieren müssen. Auf Grund dieser Tatsache kann man schon a priori auf die wichtige Rolle der Lungen im Fett- und Lipoidstoffwechsel schließen. Eine ähnliche Bedeutung für den Eiweiß-Kohlehydratstoffwechsel besitzt die Leber, das erste Organ, dem aus dem Darm resorbierte Kohlehydrate und Eiweißspaltungsprodukte durch die V. porta zugeführt werden. Zunächst wurde durch eine Reihe von Untersuchungen die Fixation des parenteral eingeführten Fettes in den Lungen festgestellt. *Mansfeld* zeigte, daß nach Infusion fein verteilter Fette in die Jugularvene im Carotisblut kaum noch Spuren des zugesetzten Fettes aufzufinden waren. Dieser Befund wurde durch die Arbeiten von *Busquet* und *Vischniac*, *Köszeg*, *Ogasawara*, *Bodó* und *Scheffer*, *Francescini* und *Vanucci* bestätigt. Eine ausführlichere Behandlung der Frage nach der Rolle der Lungen bei der Fettspeicherung findet sich in den Abhandlungen von *Roger* und *Binet*. Eben erwähnte Autoren konnten bei intravenöser Fettzufuhr keinen Fettanstieg im arteriellen Blute feststellen, ein Ergebnis, das mit den Versuchen von *Mansfeld*, sowie *Busquet* und *Vischniac* übereinstimmt. Fernerhin haben *Roger* und *Binet* bei der Untersuchung des Fettgehalts des rechten und linken Herzens von mit Fett belasteten Tieren (Hunden) gefunden, daß der Fettgehalt des arteriellen Blutes durchschnittlich 10% geringer ist als der des rechten Herzens. Die Fettanhäufung in den Lungen wurde außerdem

durch morphologische und chemische Analyse des Lungengewebes sichergestellt. Die Eigenschaft der Lungen, Fett zurückzuhalten, haben *Roger* und *Binet* mit dem Namen „Lipopexie" bezeichnet, analog der Glykopexie, womit nach *Claude Bernard* die Kohlehydratspeicherung in der Leber gemeint sein soll.

Was die Lipoide anbetrifft, so weisen *Abelous* und *Soula*, *Nietzner*, *Raimond*, *Grigaut* und *Jovannovitch*, *Nitzescu* und *Cadariu* auf die Retention von Cholesterin und Phosphatiden in den Lungen, sowie auf deren geringeren Gehalt im arteriellen Blute im Vergleich zum rechten Herzen hin. Diese Angaben stimmen mit den morphologischen Beobachtungen von *Kawamura* und *Nakanoin*, *Zinserling* überein, die nachweisen konnten, daß enteral und parenteral chronisch eingeführtes Cholesterin zum Teil in den Lungen gespeichert und zum Teil durch die Bronchien ausgeschieden wird.

In unseren vorhergehenden Mitteilungen[1] wurde gezeigt, daß die Veränderungen des Neutralfettes im Körper in engem Zusammenhang mit dem Cholesterin- und Phosphatidmetabolismus stehen, wobei bestimmte Wechselbeziehungen zwischen Fett und Lipoiden, die als Folge einer möglichen Umwandlung von Fett in Lipoide und umgekehrt angesehen wurden, aufgefunden werden konnten. Da wir früher die Fixation von Fett und Lipoiden in den Lungen besonders hervorgehoben haben, ergab sich die Notwendigkeit, den Einfluß der Fettretention in den Lungen auf den Lipoidblutspiegel und — vice versa — die Möglichkeit einer Veränderung des Neutralfettes bei Lipoidresorption aufzuklären. Mit anderen Worten — ob in den Lungen neben der Retention der Fette und Lipoide auch deren Umwandlung im oben angegebenen Sinne stattfindet.

II. Methodik und Versuchsanordnung.

Die Versuchstiere — Hunde — wurden enteral und parenteral (intravenös) mit Olivenöl, Cholesterin, Lecithin und Oleinsäure belastet. Bei der parenteralen Belastung wurde das Olivenöl und die Oleinsäure bzw. Natrium oleinicum in Form einer ganz feinen Emulsion, deren Partikelchen Erythrocytengröße besaßen, eingeführt. Das Cholesterin und Lecithin wurden in Form einer nach *Keeser*[2] hergestellten kolloidalen Lösung einverleibt. Die 10%ige alkoholische Lösung des Cholesterins bzw. Lecithins wird langsam zu siedendem Aqua dest. zutropfen gelassen; darauf wird der Alkohol abgedampft, die Lösung konzentriert und durch ein gewöhnliches *Schleicher* und *Schüll*-Filter filtriert. Da das unmittelbar in die Lungen eintretende Blut dem rechten Ventrikel angehört, während das aus den Lungen abfließende Blut arteriell ist, wurde der Fett- und Lipoidgehalt (Bestimmung nach *Bang* und *Briggs*; näheres über Einzelheiten und Veränderungen der Methodik siehe I. Mitteilung) im rechten Ventrikel und in der Arteria femoralis bestimmt. Das Blut des rechten Ventrikels wurde direkt mit Hilfe einer dünnen Nadel durch den dritten Rippen-

[1] *S. Leites*, Studien über Fett- und Lipoidstoffwechsel, I. Mitteilung: Über alimentäre Lipämie; II. Mitteilung: Über alimentäre Cholesterinämie; III. Mitteilung: Über alimentäre Lecithinämie, diese Zeitschr. **184**, 186, 1927.

[2] Ebendaselbst **154**, 321, 1924.



zwischenraum längs der Linea Parasternalis dextra entnommen; als Beweis, daß die Nadel das rechte Herz getroffen hatte, galten ihre mit dem Herzen synchronischen Schwankungen sowie das Erscheinen des Venenblutes in der Nadel. Die derart vorgenommene Blutentnahme aus dem rechten Herzen bietet bei einiger Übung keine Schwierigkeiten und wird von den Hunden ohne irgendwelche Folgen und Komplikationen vertragen. Bei der Obduktion der auf diese Weise mehrmals behandelten Hunde wurden im Herzen im allgemeinen keine pathologischen Veränderungen bemerkt. Es muß jedoch betont werden, daß die beschriebene Prozedur in einigen Fällen ein Hämopericardium zur Folge hatte; diese Versuche wurden von uns nicht berücksichtigt. Die Versuchsanordnung bei parenteraler Belastung war folgende: Der Hund wurde auf dem Tische festgebunden und die Arteria femoralis freigelegt; nach der Beruhigung des Tieres wurde das Blut mit einer Spritze aus dem rechten Herzen und der Arterie entnommen und auf Fett- und Lipoidgehalt untersucht. Nach Entnahme der Norm wurde in die Vena jugularis (während ½ bis 1 Minute) eine der obenerwähnten Lösungen eingeführt; einzeitig mit der Injektion in die Jugularvene und während derselben wurde das Blut aus der Arteria femoralis entnommen. Alsdann wurde das Blut aus dem rechten Herzen und der Arterie (gleichzeitig), in der Regel 5, 10, 20 und 30 Minuten nach der Injektion, entnommen. Um den Einfluß der Versuchsanordnung und der Injektion auf den Fett- und Lipoidblutspiegel zu ermitteln, wurde folgender Versuch mit intravenöser Einführung von *Locke*scher Lösung ausgeführt:

Hund Nr. 12. 16. September 1926.

	Neutralfett	Cholesterin			Lipoid-P
		freies	gebund.	gesamt.	
	%	%	%	%	mg-%
Arteria femoralis vor der Injektion . . .	0,040	0,047	0,048	0,095	8,6
Arteria femoralis im Moment und sofort nach der Injektion von 10 ccm *Locke*scher Lösung in die Vena jugularis . .	0,037	0,047	0,048	0,095	8,4

Der Versuch zeigt, daß die Injektionsprozedur an und für sich keinen Einfluß auf den Fett- und Lipoidblutspiegel ausübt.

Außer Versuchen an normalen Hunden wurden auch Experimente mit enteraler und parenteraler Belastung an splenektomierten und mit kolloidem Silber (Solargentum *Squibb*) bzw. kolloidalem Eisen (Ferrum saccharat.) „blockierten" Hunden ausgeführt. Hierbei wurde vor der Splenektomie bzw. vor der „Blockade" immer eine entsprechende Belastung ausgeführt, um die Resultate nach der Splenektomie bzw. „Blockade" mit denjenigen der Norm an einem und demselben Hunde vergleichen zu können. Ein Teil der Versuchstiere wurde nach Beendigung des Experiments getötet und die Lungen morphologisch und histochemisch (auf Fett und Lipoide) untersucht[1]. Im ganzen wurden 32 Versuche an 23 Hunden ausgeführt[2].

[1] Diese Untersuchungen (in Gemeinschaft mit Dr. *G. L. Derman*) werden ausführlich in Virchows Arch. veröffentlicht werden.

[2] Herrn Dr. *A. M. Tscharny* spreche ich hiermit meinen innigsten Dank für die freundliche Hilfe bei der Ausführung der Versuche aus.

III. Versuche mit parenteraler Verabreichung von Oleinsäure bzw. oleinsaurem Natrium.

Die Ergebnisse der in Tabelle I angeführten Versuche (die nicht angeführten vier Versuche ergaben ähnliche Resultate) zeigen, daß bei der Einführung von Oleinsäure bzw. Natrium oleinicum in die Jugularvene kein Anstieg der nach *Bang* Seifen enthaltenden Phosphatidfraktion im arteriellen Blute zu beobachten ist; es findet somit in den Lungen eine Fixation der Oleinsäure statt. Einzeitig wird die Einführung der Oleinsäure in die V. jugularis immer von einer Steigerung des freien und gebundenen Cholesterins im arteriellen Blute begleitet. Diese Cholesterinzunahme (23 bis 93 %) findet schon während der Injektion statt; 5 bis 30 Minuten nach der Oleinsäureeinführung bleibt das Cholesterinniveau im arteriellen Blute um 15 bis 43 % höher als im rechten Herzen, während vor Verabreichung der Oleinsäure die Cholesterinmenge in der Arterie stets niedriger ist als im rechten Ventrikel.

Die Frage nach dem Charakter und der Genese der Cholesterinvermehrung im arteriellen Blute bei Oleinsäureinjektion in die Jugularvene ist von besonderer Wichtigkeit. Stellt dieser Cholesterinanstieg eine Folge seiner Mobilisierung bzw. Ausschwemmung aus den Lungen dar oder handelt es sich dabei um eine Cholesterinbildung aus der Oleinsäure?

Folgende Tatsachen sprechen gegen die Annahme, daß die Cholesterinsteigerung im arteriellen Blute bei Oleinsäureinjektion in die Jugularvene eine Folge der Cholesterinmobilisierung ist: erstens verläuft der Cholesterinanstieg im arteriellen Blute nicht parallel mit der Neutralfettzunahme; zweitens ruft die Injektion von *Locke*scher Lösung sowie von Olivenölemulsion (s. Tabelle II) keine Cholesterinerhöhung im arteriellen Blute (in Vergleich zum rechten Herzen) hervor; dagegen beobachtet man (besonders im Moment der Injektion) eine gewisse Cholesterinsenkung, die wahrscheinlich durch die Veränderung des kolloiden Komplexes des Blutes bedingt wird[1]. Dasselbe gilt auch für das rechte Herz bei Oleinsäureverabreichung. Drittens zeigt der Kontrollversuch mit Oleinsäureeinführung in die Arteria femoralis, daß hierbei keine Cholesterinzunahme, sondern sogar eine Senkung in der Vena femoralis stattfindet:

Hund Nr. 5, Gewicht 14,0 kg. In die *Arteria femoralis* wurden 10 ccm 10 %iger Oleinsäureemulsion (in 1 %iger $NaHCO_3$) eingeführt.

	Cholesterin freies %	Cholesterin gebund. %	Cholesterin gesamt. %	Phosphatide %	Lipoid-P mg-%	Neutralfett %
Vena femoralis vor der Injektion	0,080	0,026	0,106	0,204	7,7	0,029
„ „ im Moment und sofort nach der Injektion	0,021	0,016	0,037	0,252	7,6	0,046

[1] Siehe IV. Mitteilung, diese Zeitschr. 186, 391, 1927.

Die Cholesterinzunahme im arteriellen Blute bei Oleinsäureeinführung in die Jugularvene kann also gewissermaßen für die Lungen als spezifisch angesehen werden.

Die Cholesterinsteigerung im arteriellen Blute zeigt sich somit höchstwahrscheinlich als Folge der Synthese desselben aus der Oleinsäure in den Lungen. Die Anwesenheit von freiem Sauerstoff in den Lungen berechtigt zu der Annahme einer Cholesterinbildung aus der Oleinsäure nach folgendem Schema:

$$3\,C_{18}H_{34}O_2 + O = 2\,C_{27}H_{46}O + 5\,H_2O.$$

Die Versuche mit parenteraler Oleinsäureeinführung bestätigen die von uns in den früheren Mitteilungen betonte Möglichkeit der Cholesterinbildung im Organismus aus der Oleinsäure.

Die Einführung der Oleinsäure in die V. jugularis hat außer einer Cholesterinsteigerung auch eine Phosphatid- bzw. Lipoidphosphorzunahme im arteriellen Blute zur Folge; diese Phosphatidvermehrung ist jedoch keine beständige, da sie z. B. in einigen Versuchen stark ausgeprägt erscheint, in anderen gar nicht auftritt.

Was das Neutralfett anbetrifft, so nimmt sein Gehalt in der Arterie während der Oleinsäureeinführung in die V. jugularis etwas zu; 5 bis 30 Minuten nach der Injektion ist der Neutralfettgehalt im arteriellen Blute entweder größer oder geringer als im rechten Herzen; die letzte Tatsache berechtigt zur Annahme einer Synthese des Neutralfettes sowie seiner Resorption in den Lungen. Der histochemische Befund des Neutralfettes in den Lungen nach Oleinsäureeinführung deutet auch auf die liposynthetische Rolle der Lungen hin, womit die von uns in der I. Mitteilung betonte Möglichkeit einer partiellen Resynthese des Neutralfettes im Lungengewebe bestätigt wird.

Die Oleinsäureverabreichung nach der Splenektomie hat dieselben Fett- und Lipoidveränderungen im arteriellen Blute wie bei normalen Hunden zur Folge.

Nach der „Blockade“ mit Ferrum oxydatum saccharatum nimmt die retinierende Funktion der Lungen in bezug auf Fettsäuren ab: Im Verlauf der Injektion von Oleinsäure in die Jugularvene steigt der Phosphatidfraktionsgehalt (Phosphatide + Seifen) im arteriellen Blute bei unverändertem Lipoidphosphorgehalt; infolge der verminderten Retention der Oleinsäure in den Lungen nach „Blockade“ findet eine geringe Cholesterinzunahme im arteriellen Blute statt. Die Cholesterinsteigerung im arteriellen Blute tritt 20 Minuten nach der Injektion auf; sie verläuft parallel mit der scharf ausgeprägten Neutralfettretention in den Lungen.

Tabelle I

Nr		Rechter Ventrikel: Neutral-fett %	Cholesterin freies %	Cholesterin gebund. %	Cholesterin gesamt %	„Phosphatide" %	Lipoid-P mg-%	Arteria femoralis: Neutral-fett %	Cholesterin freies %	Cholesterin gebund. %	Cholesterin gesamt. %	„Phosphatide" %	Lipoid-P mg-%
Hund 4, Gewicht 10,0 kg	Am 29. IX. 1926 wurden in die V. jugularis 10 ccm 10%iger Oleinsäureemulsion (in 1%iger $NaHCO_3$) eingeführt.												
	Vor der Injektion	0,030	0,048	0,062	0,110	0,256	9,0	0,042	0,032	0,054	0,086	0,207	8,08
	Im Moment und sofort nach der Injektion	—	—	—	—	—	—	0,044	0,034	0,132	0,166	0,200	10,2
	10′ nach der Injektion . . .	0,031	0,040	0,078	0,118	—	9,0	0,085	0,047	0,097	0,144	0,493	13,4
	30′ „ „ „ . . .	0,060	0,051	0,051	0,102	0,426	12,4	0,066	0,037	0,080	0,117	0,336	13,0
Hund 9, Gewicht 13,0 kg	Am 30. X. 1926 wurden in die V. jugularis 10 ccm 10%iger Oleinsäureemulsion (in 1%iger $NaHCO_3$) eingeführt.												
	Vor der Injektion	0,019	0,084	0,046	0,130	0,258	7,1	0,030	0,069	0,023	0,092	0,178	6,8
	Im Moment und sofort nach der Injektion	—	—	—	—	—	—	0,036	0,066	0,047	0,113	0,180	6,8
	5′ nach der Injektion	0,026	0,069	0,035	0,104	0,253	7,4	0,021	0,100	0,024	0,124	0,186	6,4
Hund 16, Gewicht 12,0 kg	Am 21. I. 1927 wurden in die V. jugularis 10 ccm 10%iger Oleinsäure-Natriumemulsion + 0,5 Glycerin eingeführt.												
	Vor der Injektion	0,053	0,065	0,045	0,110	0,245	9,2	0,065	0,030	0,034	0,064	0,223	8,6
	Im Moment und sofort nach der Injektion	—	—	—	—	—	—	0,075	0,050	0,061	0,111	0,251	9,0
	5′ nach der Injektion	0,091	0,034	0,059	0,093	0,260	9,0	0,040	0,081	0,027	0,107	0,291	9,2
Hund 18, Gewicht 10,0 kg	Am 2. II. 1927 Splenektomie. Am 12. II. 1927 wurden in die V. jugularis 10 ccm 10%iger Oleinsäureemulsion (in 1%iger $NaHCO_3$) eingeführt.												
	Vor der Injektion	0,044	0,044	0,060	0,104	0,264	10,0	0,058	0,031	0,071	0,102	0,202	9,2
	Im Moment und sofort nach der Injektion	—	—	—	—	—	—	0,038	0,045	0,084	0,129	0,288	9,4
	5′ nach der Injektion . . .	0,053	0,038	0,050	0,088	0,304	12,0	0,037	0,059	0,089	0,148	0,275	11,0
	20′ „ „ „ . . .	0,091	0,033	0,064	0,097	0,253	12,0	0,060	0,046	0,074	0,120	0,215	9,4
	Vom 13. II. bis 19. II. 1927 wurden intravenös 60 ccm 30%igen Ferrum oxydatum sacch. eingeführt. Am 19. II. 1927 wurden in die V. jugularis 10 ccm 10%iger Oleinsäureemulsion (in 1%iger $NaHCO_3$) eingeführt.												
	Vor der Injektion	0,084	0,059	0,077	0,136	0,244	11,0	0,092	0,012	0,070	0,082	0,210	10,0
	Im Moment und sofort nach der Injektion	—	—	—	—	—	—	0,082	0,026	0,070	0,096	0,316	10,0
	5′ nach der Injektion . . .	0,080	0,050	0,045	0,095	0,200	10,0	0,084	0,027	0,072	0,099	0,196	9,6
	20′ „ „ „ . . .	0,084	0,044	0,037	0,081	0,196	10,0	0,044	0,090	0,091	0,182	0,417	9,2

IV. Versuche mit enteraler und parenteraler Olivenöleinführung.

Die in Tabelle II angeführten Versuchsresultate zeigen, daß die in die Jugularvene normaler Hunde eingeführte Olivenölemulsion in den Lungen resorbiert wird: Das Neutralfettniveau im arteriellen Blute nimmt weder während der Injektion, noch 5 bis 20 Minuten nach der Einführung zu; es wird dagegen eine Abnahme des Neutralfettgehaltes sowohl im rechten Herzen als auch in der Arterie beobachtet; die Genese dieser Erscheinung ist der oben beschriebenen (und auch in der IV. Mitteilung) Cholesterinabnahme bei Veränderung des kolloidalen Komplexes des Blutes ähnlich. Dagegen kann man bei enteraler Olivenöleinführung eine gewisse Neutralfettzunahme im arteriellen Blute im Vergleich zum rechten Herzen beobachten; die erwähnte Zunahme verläuft parallel mit der Annahme der Phosphatidfraktion (Phosphatide + Seifen nach *Bang*) im arteriellen Blute. Wenn der Lipoidphosphorgehalt im rechten Herzen und der Arterie gleich bleibt, kann man von einer Rentention der Seifen in den Lungen und einer parallel verlaufenden Neutralfettresynthese sprechen (siehe auch Mitteilung 1).

Nach der Einführung von Olivenölemulsion in die Jugularvene übertrifft der Cholesterin- und Lipoidphosphorgehalt im arteriellen Blute nicht denjenigen des rechten Herzens. Bei splenektomierten Hunden wird, ähnlich wie vor der Operation, eine Neutralfettresorption beobachtet; besonders ausgeprägt ist diese Retention bei enteraler Belastung. Während vor der Splenektomie der Cholesteringehalt nach Olivenölbelastung im arteriellen Blute immer geringer ist als im rechten Herzen, verschwindet nach der Operation dieser Unterschied; besonders deutlich tritt diese Erscheinung bei ausgeprägter Neutralfettzurückhaltung in den Lungen auf (Hund Nr. 14).

Die „Blockade"versuche zeigen, daß die lipopektische Funktion der Lungen dabei abnimmt: Der Neutralfettgehalt im arteriellen Blute ist bei Olivenöleinführung — den Versuchen an „unblockierten" Hunden entgegensetzt — höher als im rechten Herzen (Hund Nr. 13 und in einem anderen, in der Tabelle nicht angeführten Versuche). Bei der „Blockade" der splenektomierten Hunde wird gleichzeitig mit der Phase des Passierens des Neutralfettes durch die Lungen (20 Minuten nach Injektion der Olivenölemulsion) auch die Erscheinung einer deutlichen Resorption des Neutralfettes beobachtet (5 Minuten nach der Injektion); die Neutralfettretention geht mit der Cholesterinzunahme im arteriellen Blute einher.

Es muß auch ein Anstieg des Lipoidphosphors im arteriellen Blute, im Vergleich zum rechten Herzen, bei parenteraler Olivenöleinführung nach der „Blockade" bemerkt werden, der bei den „unblockierten" Tieren nicht erscheint.

Tabelle 11.

Nr.		Rechter Ventrikel						Arteria femoralis					
		Neutralfett	Cholesterin			„Phosphatide“	Lipoid-P	Neutralfett	Cholesterin			„Phosphatide“	Lipoid-P
			freies	gebund.	gesamt.				freies	gebund.	gesamt.		
		%	%	%	%	%	mg-%	%	%	%	%	%	mg-%
Hund 12.	Am 16. XI. 1926 wurden in die V. jugularis 10 ccm 10%iger Olivenölemulsion (in 1%iger NaHOC$_3$) eingeführt.												
Gewicht 14,0 kg	Vor der Injektion	0,057	0,043	0,105	0,148	—	11,6	0,040	0,047	0,048	0,095	—	8,6
	Im Moment und sofort nach der Injektion	—	—	—	—	—	—	0,047	0,043	0,055	0,098	—	8,8
	5′ nach der Injektion . . .	0,037	0,075	0,046	0,121	—	10,6	0,020	0,060	0,051	0,111	—	9,4
	20′ „ „ „ . . .	0,033	0,087	0,046	0,133	—	11,8	0,016	0,077	0,050	0,127	—	11,2
Hund 13,	Vom 30. XI. bis 6. XII. 1926 wurd. intraven. 60 ccm 5%ig. Solargentum (*Squibb*) + 30 ccm 10%ig. Ferr. oxyd. sacch. eingeführt. Am 7. XII. 1926 wurden in die V. jugularis 10 ccm 10%iger Olivenölemulsion (in 1%iger NaHCO$_3$) eingeführt.												
Gewicht 16,0 kg	Vor der Injektion	0,073	0,052	0,076	0,128	—	11,6	0,044	0,049	0,080	0,129	—	11,2
	Im Moment und sofort nach der Injektion	—	—	—	—	—	—	0,060	0,068	0,085	0,153	—	10,9
	5′ nach der Injektion . . .	0,050	0,084	0,089	0,173	—	11,4	0,083	0,045	0,102	0,147	—	10,9
	20′ „ „ „ . . .	0,073	0,053	0,090	0,143	—	—	0,092	0,065	0,086	0,151	—	—
Hund 14,	Am 14. XII. 1926 wurden in die V. jugularis 10 ccm 10%iger Olivenölemulsion (in 1%iger NaHCO$_3$) eingeführt.												
Gewicht 14,0 kg	Vor der Injektion	0,068	0,051	0,107	0,158	—	11,2	0,075	0,015	0,134	0,149	—	10,8
	Im Moment und sofort nach der Injektion	—	—	—	—	—	—	0,051	0,055	0,083	0,138	—	9,6
	5′ nach der Injektion . . .	0,057	0,069	0,108	0,177	—	10,3	0,044	0,070	0,096	0,166	—	8,4
	20′ „ „ „ . . .	0,046	0,077	0,088	0,165	—	9,9	0,040	0,052	0,070	0,122	—	9,6
	Am 21. XII. 1926 Splenektomie. Am 31. XII. 1926 wurden in die V. jugularis 10 ccm 10%iger Olivenölemulsion (in 1%iger NaHCO$_3$) eingeführt.												
	Vor der Injektion	0,100	0,063	0,100	0,163	—	15,6	0,100	0,045	0,093	0,138	—	15,4
	Im Moment und sofort nach der Injektion	—	—	—	—	—	—	0,100	0,047	0,086	0,133	—	15,4
	5′ nach der Injektion . . .	0,107	0,085	0,076	0,161	—	14,3	0,079	0,113	0,089	0,202	—	11,2
	20′ „ „ „ . . .	0,174	0,016	0,106	0,122	—	15,5	0,182	0,012	0,098	0,110	—	14,6

Tabelle II (Fortsetzung).

Nr.		Rechter Ventrikel						Arteria femoralis					
		Neutralfett	Cholesterin			„Phosphatide“	Lipoid-P	Neutralfett	Cholesterin			„Phosphatide“	Lipoid-P
			freies	gebund.	gesamt.				freies	gebund.	gesamt.		
		%	%	%	%	%	mg-%	%	%	%	%	%	mg-%
Hund 14, Gewicht 14,0 kg	Vom 2. I. bis 7. I. 1927 wurden intravenös 80 ccm 5%iges Solargentum (*Squibb*) + 20 ccm 20%iges Ferr. oxyd. sacch. eingeführt. Am 8. I. 1927 wurden in die V. jugularis 10 ccm 10%iger Olivenölemulsion eingeführt.												
	Vor der Injektion	0,060	0,042	0,114	0,156	0,274	13,7	0,034	0,058	0,129	0,187	0,238	12,3
	Im Moment und sofort nach der Injektion	—	—	—	—	—	—	0,048	0,058	0,080	0,138	0,204	15,0
	5′ nach der Injektion . . .	0,078	0,023	0,094	0,117	0,229	14,0	0,036	0,060	0,134	0,194	0,294	16,0
	20′ „ „ „ . . .	0,064	0,080	0,068	0,148	0,230	—	0,088	0,018	0,105	0,123	0,211	—
Hund 22, Gewicht 11,0 kg	Am 22. III. 1927 wurden per os 5 g Cholesterin + 100,0 Ol. olivarum eingeführt.												
	Vor der Einführung	0,062	0,051	0,029	0,080	0,315	9,0	0,068	0,020	0,037	0,057	0,232	7,0
	5 Std. nach der Einführung .	0,047	0,073	0,081	0,154	0,322	9,2	0,054	0,062	0,054	0,116	0,251	8,6
	Am 24. III. 1927 Splenektomie. Am 1. IV. 1927 wurden per os 5 g Cholesterin + 100,0 Ol. olivarum eingeführt.												
	Vor der Einführung	0,075	0,059	0,039	0,098	0,324	10,0	0,114	0,011	0,070	0,081	0,240	9,2
	5 Std. nach der Einführung .	0,350	0,046	0,105	0,151	0,334	10,4	0,260	0,070	0,081	0,151	0,264	10,0
Hund 23, Gewicht 10,5 kg	Am 13. IV. 1927 wurden per os 100,0 Ol. olivarum eingeführt.												
	Vor der Einführung	0,073	0,050	0,061	0,111	0,333	9,3	0,091	0,025	0,076	0,101	0,212	8,2
	5 Std. nach der Einführung .	0,076	0,102	0,083	0,185	0,378	10,7	0,085	0,062	0,119	0,181	0,246	10,0
	Vom 13. bis 16. IV. 1927 wurden intravenös 20 ccm 10%iges Solargentum (*Squibb*) eingeführt. Am 16. IV. 1927 wurden per os 100,0 Ol. olivarum eingeführt.												
	Vor der Einführung	0,041	0,046	0,049	0,095	0,226	11,2	0,062	0,020	0,080	0,100	0,200	11,0
	5 Std. nach der Einführung .	0,102	0,160	0,073	0,233	0,400	14,0	0,110	0,097	0,051	0,148	0,360	13,8

V. Versuche mit parenteraler Einführung von Cholesterinsol.

Die Resultate der in Tabelle III angeführten Versuche (ähnliche Ergebnisse wurden noch in drei unerwähnten Versuchen erhalten) zeigen, daß die Cholesterinsoleinführung in die V. jugularis während der ersten 20 Minuten nach der Injektion keine Cholesterinvermehrung im arteriellen Blute hervorruft; es ist dagegen eine Abnahme festzustellen, über deren mögliche Ursachen wir mehrmals berichtet haben. Ein gewisser zu beobachtender Anstieg des Cholesterins im arteriellen Blute bei Einführung großer Dosen von Cholesterinsol ist so gering, daß daraus kein bestimmter Schluß gezogen werden kann. Nach der Splenektomie wird bei parenteraler Einführung von Cholesterinsol in einigen Versuchen eine gewisse Cholesterinzunahme im arteriellen Blute beobachtet, in anderen nicht; das Niveau ist aber in der Arterie nicht höher als im rechten Herzen. Dasselbe gilt auch für die „Blockade“-versuche, in denen 20 Minuten nach der Cholesterinsoleinführung eine recht starke Cholesterinzunahme im rechten Herzen mit gleichzeitiger Neutralfettabnahme stattfindet. Bei normalen und splenektomierten Tieren wird dies nicht beobachtet. Diese Tatsache haben wir bereits in der IV. Mitteilung über die Rolle des r.-e. Systems im Fett- und Lipoidstoffwechsel betont und aufgeklärt..

Somit weisen die Versuche mit parenteraler Cholesterineinführung, sowie die in der II. Mitteilung beschriebenen Versuche mit enteraler Cholesterinbelastung auf die cholesterinresorbierende Funktion der Lungen hin. Diese Lungenfunktion kommt auch in dem normalerweise bestehenden Unterschied im Cholesterinniveau der Arterie und des rechten Herzens zum Ausdruck: Von 23 untersuchten Hunden war bei 18 das Cholesterinniveau im arteriellen Blute um 20 bis 50% geringer, als im rechten Herzen.

Die parenterale Cholesterinsoleinführung hatte stets, ohne eine Cholesterinsteigerung im arteriellen Blute hervorzurufen, eine Neutralfettzunahme in der Arterie zur Folge. Dasselbe gilt auch in geringem Grade für den Lipoidphosphor.

VI. Versuche mit parenteraler Lecithinsoleinführung.

Die in der Tabelle IV angeführten Versuche mit Verabreichung von Lecithinsol in die Jugularvene zeigen, daß das parenteral eingeführte Lecithin in den Lungen zurückgehalten wird; der Lipoidphosphorgehalt im arteriellen Blute und im Blute des rechten Herzens bleibt dasselbe wie vor der Injektion. Es läßt sich dabei eine Neutralfett- und Cholesterinzunahme im arteriellen Blute feststellen. Bei splenektomierten Hunden liefert die Lecithinsoleinführung ähnliche Resultate

Tabelle III.

Nr.		Rechter Ventrikel						Arteria femoralis					
		Neutralfett	Cholesterin			„Phosphatide"	Lipoid-P	Neutralfett	Cholesterin			„Phosphatide"	Lipoid-P
			freies	gebund.	gesamt.				freies	gebund.	gesamt.		
		%	%	%	%	%	mg-%	%	%	%	%	%	mg-%
Hund 3, Gewicht 10,0 kg	Am 13. IX. 1926 wurden in die V. jugularis 5 ccm 2%igen Cholesterinsols eingeführt.												
	Vor der Injektion	0,016	0,077	0,068	0,145	—	—	0,021	0,057	0,060	0,117	0,264	9,8
	Im Moment und sofort nach der Injektion	—	—	—	—	—	—	0,024	0,051	0,054	0,105	0,306	10,3
	6′ nach der Injektion	0,050	0,061	0,046	0,107	0,312	10,8	0,080	0,023	0,041	0,064	0,264	12,7
	20′ „ „ „	0,051	0,045	0,046	0,091	—	—	0,051	0,027	0,058	0,085	0,302	9,57
Hund 19, Gewicht 12,5 kg	Am 29. I. 1927 wurden in die V. jugularis 10 ccm 4,5%igen Cholesterinsols eingeführt.												
	Vor der Injektion	0,074	0,052	0,091	0,143	—	13,3	0,069	0,065	0,070	0,135	0,250	12,6
	Im Moment und sofort nach der Injektion	—	—	—	—	—	—	0,060	0,036	0,059	0,095	—	13,6
	5′ nach der Injektion	0,057	0,038	0,077	0,115	—	14,6	0,072	0,071	0,054	0,125	—	13,3
	20′ „ „ „	0,058	0,056	0,036	0,092	—	13,8	0,102	0,003	0,102	0,105	—	12,6
	Am 1. II. 1927 Splenektomie. Am 7. II. 1927 wurden in die V. jugularis 10 ccm 4,5%igen Cholesterinsols eingeführt.												
	Vor der Injektion	0,061	0,105	0,059	0,164	—	14,6	0,066	0,093	0,060	0,153	—	12,2
	Im Moment und sofort nach der Injektion	—	—	—	—	—	—	0,079	0,064	0,061	0,125	—	12,2
	5′ nach der Injektion	0,080	0,081	0,095	0,176	—	—	0,064	0,086	0,050	0,136	—	12,5
Hund 20, Gewicht 12,0 kg	Am 9. II. 1027 Splenektomie. Am 25. II. 1927 wurden in die V. jugularis 10 ccm 4,5%igen Cholesterinsols eingeführt.												
	Vor der Injektion	0,031	0,077	0,117	0,194	0,343	13,2	0,037	0,063	0,048	0,111	0,320	12,6
	Im Moment und sofort nach der Injektion	—	—	—	—	—	—	0,042	0,059	0,052	0,111	0,300	12,6
	5′ nach der Injektion	0,042	0,061	0,067	0,128	—	12,4	0,052	0,071	0,061	0,132	0,328	13,0
	20′ „ „ „	0,092	0,046	0,080	0,126	0,350	12,8	0,056	0,056	0,077	0,133	0,340	13,0
	Vom 25. II. bis 3. III. 1927 wurden 60 ccm 30%igen Ferr. oxyd. sacch. intravenös eingeführt. Am 4. III. 1927 wurden intravenös 10 ccm 4,5%igen Cholesterinsols eingeführt.												
	Vor der Injektion	0,083	0,012	0,088	0,100	0,316	14,3	0,076	0,028	0,067	0,095	0,262	14,4
	Im Moment und sofort nach der Injektion	—	—	—	—	—	—	0,076	—	0,067	0,067	—	13,1
	5′ nach der Injektion	0,088	0,015	0,108	0,123	—	—	0,048	0,063	0,060	0,123	—	—
	20′ „ „ „	0,048	0,077	0,075	0,152	—	—	0,096	0,024	0,055	0,079	—	—

Tabelle IV.

Nr.		Rechter Ventrikel						Arteria femoralis					
		Neutralfett	Cholesterin			„Phosphatide“	Lipoid-P	Neutralfett	Cholesterin			„Phosphatide“	Lipoid-P
			freies	gebund.	gesamt.				freies	gebund.	gesamt		
		%	%	%	%	%	mg-%	%	%	%	%	%	mg-%
Hund 3, Gewicht 10,0 kg	Am 17. IX. 1926 wurden in die V. jugularis 10 ccm 3,2%igen Lecithinsols (Gehe A.-G.) eingeführt.												
	Vor der Injektion	0,018	0,075	0,063	0,138	—	9,9	0,028	0,053	0,013	0,066	—	9,0
	Im Moment und sofort nach der Injektion	—	—	—	—	—	—	0,055	0,060	0,078	0,138	—	8,7
	5' nach der Injektion	0,067	0,041	0,070	0,111	—	9,7	0,060	0,052	0,060	0,112	—	9,0
	20' „ „ „	0,048	0,067	0,065	0,132	—	9,3	0,028	0,090	0,048	0,138	—	9,1
Hund 15, Gewicht 11,2 kg	Am 27. XII. 1926 wurden in die V. jugularis 10 ccm 3,2%igen Lecithinsols (Gehe A.-G.) eingeführt.												
	Vor der Injektion	0,032	0,050	0,072	0,122	0,237	10,7	0,032	0,046	0,073	0,119	0,220	10,0
	Im Moment und sofort nach der Injektion	—	—	—	—	—	—	0,031	0,046	0,095	0,141	0,218	9,48
	5' nach der Injektion	0,048	0,030	0,045	0,075	0,291	10,7	0,053	—	—	—	—	10,0
	20' „ „ „	0,052	0,090	0,036	0,126	0,230	10,0	0,076	0,042	0,073	0,115	—	9,97
Hund 15a, Gewicht 12,4 kg	Am 28. XII. 1926 Splenektomie. Am 14. I. 1927 wurden in die V. jugularis 10 ccm 32%igen Lecithinsols (Gehe A.-G.) eingeführt.												
	Vor der Injektion	0,088	0,059	0,064	0,123	0,252	13,6	0,114	0,018	0,059	0,077	0,231	12,8
	Im Moment und sofort nach der Injektion	—	—	—	—	—	—	0,119	0,026	0,049	0,075	0,238	12,8
	5' nach der Injektion	0,120	0,021	0,058	0,079	0,242	13,2	0,098	0,044	0,080	0,124	0,250	12,8
	20' „ „ „	0,088	0,060	0,062	0,122	—	13,8	0,070	0,102	0,047	0,149	—	12,4
Hund 21, Gewicht 13,0 kg	Vom 14. bis 20. III. 1927 wurden intravenös 60 ccm 5%iges Solargentum (*Squibb*) eingeführt. Am 21. III. 1927 wurden in die V. jugularis 10 ccm 3,2%igen Lecithinsols (Gehe A.-G.) eingeführt.												
	Vor der Injektion	0,047	0,058	0,135	0,193	0,309	13,0	0,053	0,035	0,163	0,198	0,195	12,0
	Im Moment und sofort nach der Injektion	—	—	—	—	—	—	0,064	0,050	0,104	0,154	0,376	12,0
	5' nach der Injektion	0,066	0,051	0,078	0,129	0,400	12,0	0,061	0,064	0,103	0,167	0,189	11,0

wie bei normalen, mit Ausnahme der Neutralfettsteigerung im arteriellen Blute; das Neutralfettniveau bleibt dabei jedoch im rechten Herzen gesteigert. Der letzte Umstand berechtigt zu der Schlußfolgerung, daß auch bei splenektomierten Hunden die Lecithinresorption in den Lungen einen Neutralfettanstieg zur Folge hat; allein im Zusammenhang mit der oben erwähnten Steigerung der lipopektischen Funktion der Lungen nach Splenektomie wird das Niveau des Neutralfettes im arteriellen Blute nicht erhöht. Nach der „Blockade" ruft die Lecithinsoleinführung eine recht große Zunahme der Phosphatide + Seifen (nach *Bang*) enthaltenden Phosphatidfraktion hervor, ohne den Lipoidphosphorgehalt im arteriellen Blute zu beeinflussen. Während der Lipoidphosphor dabei unverändert bleibt, muß die Phosphatiderhöhung auf Kosten der Seifen abgetragen werden. 5 Minuten nach der Lecithinsoleinführung bei „blockierten" Hunden findet eine starke Senkung des Seifengehaltes im arteriellen Blute (im Vergleich zum rechten Herzen) statt, wobei gleichzeitig eine Zunahme des Cholesterins erfolgt.

Die erwähnten Angaben veranlassen zu dem Schluß, daß nicht nur eine Lecithinresorption, sondern auch dessen Spaltung in den Lungen stattfindet. Es sind nämlich die Lecithin-Spaltprodukte — Fettsäuren —, welche die bei parenteraler Lecithineinführung auftretende Neutralfett- und Cholesterinsteigerung im arteriellen Blute bedingen, da, wie oben erwähnt, die Anwesenheit von Fettsäuren in den Lungen die Vermehrung des Cholesterins und Neutralfettes in der Arterie bestimmt. Daß die Cholesterinsteigerung im arteriellen Blute bei Lecithinsoleinführung wirklich ein Resultat der Spaltung des Lecithins ist und durch Spaltprodukte — Fettsäuren (Seifen) — bedingt wird, zeigt der „Blockade"versuch. Nach der „Blockade" (s. oben), wenn die retinierende Funktion der Lungen in bezug auf Fettsäuren abnimmt, wird die Lecithinsoleinführung von einer Fettsäuren-(Seifen-)Zunahme im arteriellen Blute begleitet, während das Cholesterinniveau des letzteren unverändert bleibt. Findet nun 5 Minuten nach der Einführung Fettsäuren-(Seifen-)Resorption in den Lungen statt, so beobachtet man im arteriellen Blute eine bedeutende Cholesterinvermehrung im Vergleich zum rechten Herzen. Die histochemische Untersuchung der Lungen ergab das Vorhandensein von Fettsäuren und Neutralfett bei Lecithineinführung.

Somit haben die Versuche mit parenteraler Lecithineinführung nochmals die von uns oben gezeigte Abhängigkeit der Cholesterinsteigerung im arteriellen Blute von der Fettsäurenresorption in den Lungen bestätigt. Eine ähnliche Beziehung wurde auch in den Versuchen mit enteraler Lecithineinführung (s. Mitteilung III[1]) festgestellt.

---

[1] *S. Leites*, „Über alimentäre Lecithinämie", diese Zeitschr. **184**, 310, 1927.

VII. Diskussion.

Faßt man die erhaltenen Resultate zusammen, so läßt sich zunächst die retinierende Funktion der Lungen gegenüber parenteral eingeführtem Neutralfett, Oleinsäure, Cholesterin und Lecithin, — die Erscheinung der Lipo- und Lipoidopexie in den Lungen — feststellen, wie wir in unseren früheren Mitteilungen in Versuchen mit enteraler Einführung zeigen konnten. Da die morphologischen Untersuchungen ergeben haben, daß bei der „Blockade" mit Ferr. oxyd. sacch. das Eisen hauptsächlich in den Alveolarseptazellen und nur zum geringen Teil im Alveolarepithel aufgespeichert wird, da fernerhin nach der „Blockade" eine Abnahme der retinierenden Funktion der Lungen bezüglich der Fettsäuren und teilweise des Neutralfettes stattfindet, so muß vorausgesetzt werden, daß die lipopektische Funktion der Lungen in der Hauptsache mit dem histiozytären Apparat verbunden ist.

Da durch unsere Versuche die lipo- und lipoidopektische Funktion der Lungen bestätigt wird, sind wir zu dem Schluß berechtigt, daß sich die Rolle der Lungen nicht nur auf die Resorption der eingeführten Fette und Lipoide beschränkt, sondern daß einzeitig damit auch Umwandlungen der resorbierten Substanzen stattfinden. In früheren Mitteilungen wurde öfters der innige Zusammenhang zwischen den quantitativen Veränderungen des Neutralfettes und des Cholesterins im Blute betont; diese Beziehung besteht darin, daß unter gewissen Bedingungen die Neutralfett- bzw. Fettsäureabnahme von einer Cholesterinzunahme, und — umgekehrt — eine Cholesterinsenkung von einer Neutralfettsteigerung begleitet wird. Diese Wechselbeziehungen wurden von uns auf Grund einer Reihe von Versuchen als Folge einerseits einer möglichen Cholesterinbildung aus Neutralfett (durch Fettsäuren) und, andererseits, einer Neutralfettbildung aus Cholesterin betrachtet. Das erwähnte bestimmte Verhältnis zwischen Neutralfett bzw. Fettsäuren (Seifen) und Cholesterin tritt auch bei der Lipo- und Lipoidopexie in den Lungen auf. Die Retention der Fettsäuren in den Lungen, sowohl bei unmittelbarer Einführung als auch bei der Bildung in loco nach Lecithineinführung, wird von einer Cholesterinsteigerung im arteriellen Blute begleitet; falls diese Retention (nach der „Blockade") ausbleibt, steigt der Cholesteringehalt im arteriellen Blute nicht. Die oben angeführten Betrachtungen (s. Versuche mit Oleinsäureeinführung) geben uns Veranlassung, eine Cholesterinsynthese aus Fettsäuren bei deren Retention oder Bildung (aus Phosphatiden bzw. Lecithin) in den Lungen vorauszusetzen. Parallel mit den Cholesterinbildungsprozessen in den Lungen findet dort auch, wie bereits erwähnt, eine Resorption des Cholesterins statt, die nicht nur bei enteraler und parenteraler Einführung, sondern auch in der Norm, d. h. ohne Belastung, beobachtet wird. Gleichzeitig mit der

Cholesterinresorption in den Lungen ist eine Neutralfettzunahme im arteriellen Blute festzustellen. Es kann nicht genau ermittelt werden, ob diese Neutralfettzunahme als Folge der Cholesterinspaltung in den Lungen, der sogenannten Cholesterindiärese mit nachfolgender Liposynthese aus den Cholesterinspaltungsprodukten erscheint, da unsere Versuche keinen unmittelbaren Anhaltspunkt dafür ergeben. Wir können diesbezüglich nur Vermutungen aussprechen. Deutlicher tritt die liposynthetische Funktion der Lungen bei parenteraler Oleinsäurebelastung und besonders bei enteraler Olivenöleinführung hervor, wenn im arteriellen Blute (im Vergleich zum rechten Herzen) das Neutralfett parallel der Fettsäurenabnahme zunimmt. Für die Möglichkeit einer Liposynthese in den Lungen sprechen auch die Untersuchungen von *Hamsik* und *Lombroso* an Lungengewebe.

Was die Retention des Neutralfettes in den Lungen anbetrifft, so ist diese bei weitem nicht so ausgeprägt wie in bezug auf Fettsäuren und Lipoide. Bei splenektomierten Hunden hat die parenterale Olivenöleinführung eine ziemlich bedeutende Neutralfettzunahme im rechten Herzen und der Arterie zur Folge. Der letzte Umstand hängt auf Grund der vorhergehenden Mitteilung (V)[1], von dem Milzausfall ab, d. h. desjenigen Organs, in welchem die Neutralfettelimination stattfindet. Auf solche Weise wird das parenteral eingeführte Olivenöl im ersten Augenblick in den Lungen zurückgehalten, um allmählich aus diesen ausgeschieden und sekundär in der Milz gespeichert zu werden. Nach der Milzexstirpation wird, wenn die sekundäre Neutralfettelimination ausbleibt, eine Neutralfettzunahme im rechten Herzen beobachtet. Der Neutralfettgehalt im arteriellen Blute ist jedoch geringer als im rechten Herzen.

Die Ergebnisse unserer Versuche berechtigen kaum zu einer sicheren Entscheidung, ob gleichzeitig mit Lipopexie auch Lipodiärese, d. h. Neutralfettspaltung in den Lungen stattfindet. Dies gilt zum mindesten für die normalen Hunde, denn die Neutralfettretention in den Lungen hat keine bedeutenden Veränderungen hinsichtlich der Seifen und Lipoide im arteriellen Blute zur Folge. Es ist möglich, daß der letzte Umstand von der kurzdauernden Neutralfettretention in den Lungen abhängt. Anders verhält es sich bei splenektomierten Hunden: Die Neutralfettretention in den Lungen, sowohl bei unmittelbarer Einführung (Tabelle II, Hunde Nr. 14 und Nr. 22) als auch bei Neutralfettzunahme im rechten Herzen nach Belastung mit Fettsäuren und Lecithin (Tabelle I, Hund Nr. 18 und Tabelle IV, Hund Nr. 15a), hat eine Cholesterinsteigerung im arteriellen Blute zur Folge. Da die Cholesterinzunahme, wie oben erwähnt, im Zusammenhang mit der Fettsäuren-

[1] Diese Zeitschr. 186, 436, 1927.

retention in den Lungen steht, kann man voraussetzen, daß die Neutralfettresorption in den Lungen nach Splenektomie dessen Spaltung unter Bildung der die erhöhte Cholesterinvermehrung bestimmenden Fettsäuren bewirkt.

Bekanntlich findet bei splenektomierten Tieren eine Histiomonocytose statt (*Domagk*, *Paschkis*, *Schittenhelm* und *Erhardt*, *Huber*, *Azzurini* und *Massart*). Es tritt dabei in den Lungen eine Verschleppung von Histiomonocyten hepatogener Herkunft auf (abgestoßene und in die Blutbahn gelangte *Kupffer*sche Zellen, *Aschoff*, *Kiyono*, *Wentzlaff*). Der letzte Umstand berechtigt zu der Annahme, daß der mögliche Lipodiäreseprozeß in den Lungen splenektomierter Hunde eben mit den Histiomonocyten hepatogener Herkunft zusammenhängt, um so mehr, als in der Vena hepatica normaler Hunde, auf Grund unserer Mitteilungen I, II, IV[1], Cholesterinsteigerung mit paralleler Fettabnahme stattfindet. Bei splenektomierten Tieren, bei denen die Neutralfettretention mit paralleler Cholesterinsteigerung in der V. hepatica, wie in der I. Mitteilung betont wird, sehr wenig ausgeprägt ist, spielt die Lunge also eine kompensatorische Rolle. Bei der „Blockade" splenektomierter Hunde tritt die Erscheinung der Cholesterinzunahme im arteriellen Blute bei Neutralfettretention in den Lungen noch deutlicher auf, was der oben erwähnten Voraussetzung über den Zusammenhang zwischen Lipodiärese und Histiomonocytose in der Lunge entspricht; die „Blockade" führt bekanntlich zur Histiomonocytose (*Büngeler*, *Schittenhelm* und *Erhardt*, *Simpson*, *Wentzlaff*). Die Tatsache, daß das erwähnte Phänomen nach der „Blockade" nicht konstant ist, wird möglicherweise durch Abnahme der lipopexischen Funktion der Lunge (s. oben) einerseits, und andererseits (bei nicht splenektomierten Hunden) durch die dabei in der Lunge auftretende Verschleppung der Histiomonocyten nicht nur hepato- sondern auch lienogener Herkunft bedingt; in den Splenocyten kann, auf Grund unserer vorhergehenden Mitteilungen, sowohl Neutralfettspeicherung mit paralleler Cholesterinzunahme, als auch Cholesterinretention mit paralleler Neutralfettsteigerung stattfinden.

Unsere Befunde erlauben somit den Schluß, daß die Lipo- und Lipoidopexie in den Lungen bestimmte Veränderungen im Fett- und Lipoidblutspiegel des arteriellen Blutes hervorrufen, welche als eine Folge der Umwandlung der in die Lunge gelangten Fette und Lipoide betrachtet werden kann. Dieser Metabolismus kann sowohl als Lipo- und Lipoidosynthese, als auch in Form einer Lipo- und Lipoidodiärese auftreten.

[1] Diese Zeitschr. **184**, **186**, 1927.

Schlußfolgerungen.

1. Die in die Jugularvene eingeführten Olivenöl- und Oleinsäureemulsionen, die Cholesterin- und Lecithinsole gelangen im arteriellen Blute normaler Hunde nicht zur Beobachtung.

2. Nach vorangehender „Blockade" mit Solargentum bzw. Ferr. oxyd. sacch. hat die Injektion der Olivenöl- bzw. Fettsäureemulsion in die Jugularvene eine Zunahme von Neutralfett bzw. von Fettsäuren im arteriellen Blute zur Folge.

3. Bei parenteraler Einführung von Oleinsäure bzw. Natrium oleinicum (in die Jugularvene) wird die Retention der letzteren in der Lunge von einer Cholesterin- und Neutralfettzunahme im arteriellen Blute begleitet. Im Kontrollversuch ruft die Einführung der Oleinsäure in die Arteria femoralis keine Zunahme des Cholesteringehaltes in der Vena femoralis hervor.

4. Bei parenteraler Einführung (in die Jugularvene) von Lecithinsol wird zugleich mit der Lecithinresorption in der Lunge eine Vermehrung von Cholesterin und Neutralfett im arteriellen Blute beobachtet. Wenn sich nach der „Blockade" bei der Retention von Lecithin in den Lungen die Menge der Fettsäuren (Seifen) im arteriellen Blute vermehrt, nimmt dessen Cholesteringehalt nicht zu.

5. Bei Belastung per os mit Olivenöl erhöht sich parallel mit der Retention der Fettsäuren (Seifen) in den Lungen der Neutrafettgehalt im arteriellen Blute.

Punkt 3 bis 5 gestattet die Voraussetzung einer möglichen Cholesterin- und Neutralfettsynthese aus der in der Lunge resorbierten Oleinsäure.

6. Bei splenektomierten Hunden steigt bei enteraler und parenteraler Olivenöleinführung der Cholesteringehalt im arteriellen Blute.

7. Bei Einführung von Cholesterinsol in die Jugularvene wird eine Zunahme von Neutralfett im arteriellen Blute, die mit der Cholesterinretention in den Lungen parallel verläuft, beobachtet.

8. Die erwähnten Befunde berechtigen die Annahme einer Lipoidopexie in der Lunge mit paralleler Lipoidodiärese und Liposynthese einerseits, einer Lipopexie mit paralleler Lipoidosynthese andererseits.

Literatur.

Aschoff, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **50**, 1926. — *Abelous* et *Soula*, C. r. de la Soc. de Biol. **85**, 6, 1921. — *Büngeler*, Zieglers Beitr. **76**, 1926. — *Busquet* et *Vischniae*, zitiert nach *Roger*. — *Boddò* und *Scheffer*, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **124**, 1927. — *Domagk*, Virchows Arch. **249**, 1924. — *Francescini* und *Vanucci*, Ber. über d. ges. Phys. **40**, 1927. — *Grigaut* et *Jovanovitch*, C. r. de la Soc. de Biol. **92**, Nr. 1, 1925. — *Kawamura*, „Morphologie und Physiologie der Cholesterinsteatose". Jena, Fischer, 1925. —

Kiyono, „Vitale Karminspeicherung" Jena. 1914. — *Köszeg*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **101**, 1924. — *Hamsik*, Zeitschr. f. phys. Chem. **90**, 1914. — *Lombroso*, Arch. intern. de Phys. **22**, 1, 9, 1923. — *Mansfeld*, zitiert n. *Köszeg*. — *Nitzescu* et *Cadariu*, Kongr.-Zentralbl. **40**, H. 5. 1925. — *Ogasawara*, Ber. ü. d. ges. Phys. u. Pharm. **35**, H. 3/4, 1926. — *Paschkis*, Virchows Arch. **259**, 1926. — *Roger*, „Questions actuelles de biologie medicale. Paris, Masson, 1922. — *Roger* et *Binet*, *Verne*, Bull. de. l'Acad. de médécine **86**, 129, 1921; **86**, 79, 203, 1922; **88**, 1140, 1923. — *Sicard*, *Fabre*, *Forestier*, ebendaselbst **88**, 564, 1255, 1923. — *Schmitz* und *Peiser*, diese Zeitschr. **160**, 20, 1925. — *Schittenhelm* und *Erhardt*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **45**, 46, 1925. — *Simpson*, zitiert nach *Büngeler*. — *Wentzlaff*, Zieglers Beitr. **72**, 1924. — *Zinserling*, ebendaselbst **71**, 1923. — *Nietzner*, Kongr.-Zentralbl. **36**, 242. — *Raimond*, Ber. ü. d. ges. Phys. **27**, 342. — *Azzurini* et *Massart*, *Huber*, zitiert nach *Schittenhelm* und *Erhardt*, siehe frühere Mitteilungen.

I. Über die experimentellen Beweise der Formaldehyd-assimilationshypothese[1].

II. Die enzymatische Kondensation des Formaldehyds zu Zucker[1].

Von

J. Bodnár, Lili Eveline Róth und **Clara Bernauer.**

(Aus dem kgl. ung. pflanzenbiochemischen Institut in Budapest und aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität in Debreczen.)

(Eingegangen am 19. September 1927.)

I. Theoretischer Teil.

Unter den im grünen Pflanzenorganismus sich abspielenden zahlreichen synthetischen Prozessen ist die in den Blättern vorgehende Kohlensäureassimilation bzw. die Entstehung des Zuckers aus der Luftkohlensäure von ganz besonderer Wichtigkeit. Die Aufklärung des Chemismus der Kohlensäureassimilation ist ein Problem von größter Tragweite in der Biochemie und auf seine Bedeutung wies auch *Emil Fischer*[2] mit folgenden Worten hin: „Bedenkt man, daß die Assimilation der Kohlensäure durch die Pflanzen die Grundbedingung für die Existenz der lebenden Wesen ist, so muß auch die kleinste Beobachtung, welche zur Aufklärung dieses geheimnisvollen Vorganges führen kann, wertvoll erscheinen."

Auf Grund jener Beobachtung *Butlerows*[3], daß aus Formaldehyd durch Kalkwasser Zucker entsteht, stellte *A. v. Bayer*[4] seine Formaldehydassimilationshypothese auf, laut der der Zucker in den Blättern aus der Luftkohlensäure durch den Formaldehyd als Zwischenprodukt entsteht.

---

[1] Die in dieser Mitteilung publizierten Untersuchungen wurden in den Sommermonaten der Jahre 1924, 1925 und 1926 durchgeführt.

[2] *E. Fischer* und *F. Passmore*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **22**, 359, 1889.

[3] *Butlerow*, Liebigs Ann. **120**, 296, 1861.

[4] *A. v. Bayer*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **3**, 63, 1870.

Bei den zum Beweis der *Bayer*schen Hypothese dienenden Experimenten wurde untersucht, 1. ob in den assimilierenden Blättern Formaldehyd nachweisbar ist, 2. ob die Blätter bzw. die grünen Pflanzen den hinzugelangten Formaldehyd aufnehmen und als Nährstoff so verwerten können, daß eine Zunahme des Trockensubstanz- und Kohlenhydratgehaltes der Blätter festgestellt werden kann.

Zahlreiche Forscher[1] befaßten sich mit dem Nachweis des Formaldehyds in grünen Blättern, ohne daß diese Untersuchungen zu einem absolut positiven Resultat geführt hätten. *Fincke*[2] deutete auf den wichtigen Umstand hin, daß, wenn man zu dem aus grünen Blättern bereiteten Brei eine kleine Menge von Formaldehyd hinzufügt und mit Wasserdampf destilliert, der Formaldehyd im Destillat nicht nachgewiesen werden kann. Dies ist so erklärlich, daß gewisse Substanzen der Blätter den Formaldehyd binden, es kann also der in den assimilierenden Blättern intermediär vorhandene Formaldehyd nicht nachgewiesen werden.

Zuletzt trachteten *Klein* und *Werner*[3], auf eine von dem alten Verfahren ganz abweichende Weise Formaldehyd in den assimilierenden Blättern nachzuweisen. Bekanntlich war es *Neuberg*[4] durch Anwendung von Na_2SO_3 und Dimedon (Dimethylhydroresorcin) gelungen, den größten Teil des bei der alkoholischen Gärung als Zwischenprodukt entstandenen Acetaldehyds zu fixieren und dadurch die Reduktion zum Alkohol zu verhindern. Die *Neuberg*sche „Abfangmethode" war nicht nur bei der alkoholischen Gärung anwendbar, sondern es gelang damit die Entstehung des Acetaldehyds als Zwischenprodukt in Mikroorganismen, in höheren Pflanzen[5] und auch bei den im tierischen Organismus ablaufenden zuckerzersetzenden Prozessen nachzuweisen. *Klein* und *Werner* verwendeten die *Neuberg*sche „Abfangmethode" zum Nachweis des in den assimilierenden grünen Blättern entstandenen Formaldehyds, und es glückte ihnen, durch Anwendung von Dimedon die Kondensationsprodukte des Formaldehyds mit Dimedon (Formaldomedon) in gut meßbarer Menge zu gewinnen. Die genannten Forscher trachteten durch zahlreiche Kontrolluntersuchungen sich davon zu überzeugen, ob der auf die oben erwähnte Weise nachgewiesene Formaldehyd tatsächlich während der Assimilation entstanden ist. Unter anderem berichteten sie über ihre Wahrnehmungen, daß bei den im Dunkeln ausgeführten Experimenten überhaupt keine, hingegen bei den in der kohlensäurefreien Dimedonlösung im Sonnenlicht belassenen Pflanzen in kaum nachweisbaren Spuren Formaldomedon entstanden sei; im letzteren Falle bildete sich eine geringe Menge von Formaldehyd durch die Assimilation der Atmungskohlensäure der Pflanzen.

---

[1] *H. Schroeder*, Die Hypothesen über die chemischen Vorgänge bei der Kohlensäureassimilation, S. 98. Jena 1917. „. . . Bei alledem ist noch zu berücksichtigen, daß wohl nach keinem Produkt des Pflanzenkörpers annähernd mit der gleichen Ausdauer gesucht wurde wie gerade nach dem Ameisenaldehyd."

[2] *H. Fincke*, diese Zeitschr. 52, 214, 1913.

[3] *S. Klein* und *O. Werner*, ebendaselbst **168**, 361, 1926.

[4] *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, ebendaselbst **89**, 365, 1918; **106**, 281, 1920.

[5] *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, ebendaselbst **151**, 167, 1924; **160**, 256, 1925; *J. Bodnár*, *Ch. Szepessy* und *J. Ferenczy*, ebendaselbst **165**, 16, 1925.

Obwohl die Entstehung des Formaldehyds in assimilierenden grünen Blättern auf Grund der Befunde von *Klein* und *Werner* ganz sicher festgestellt wurde, sind jene Untersuchungen nicht überflüssig, sondern äußerst wichtig, bei denen man auf geeignete Weise solche Formaldehydverbindungen (Methylal, formaldehydschwefligsaures Natrium), aus denen der Formaldehyd leicht abspaltbar ist, oder in kleinen Mengen freien Formaldehyd zu den Pflanzen gelangen ließ und ermittelte, ob durch Einwirkung des Formaldehyds der Trockensubstanzgehalt der Untersuchungsobjekte zunahm bzw. ob aus Formaldehyd Stärke oder Zucker entstanden ist.

Die ersten Versuche in dieser Richtung wurden von *Bokorny*[1] mit Algen durchgeführt. Er hielt die Algen in Methylallösung $[H_2C(OCH_3)_2]$ und fand eine Stärkebildung; dieser Versuch hatte jedoch keine Beweiskraft, da die Stärke bloß bei Sonnenlicht entstand, und nicht nur aus dem Formaldehyd, sondern auch aus Methylalkohol konnte er eine Stärkebildung wahrnehmen. Weder *Loews*[2] noch *Bokornys*[3] Versuche, zu denen sie formaldehydschwefligsaures Natrium verwendeten, führten zu einem positiven Resultat. Später teilte *Bokorny*[4] mit, daß es ihm bei Algen, welche sich in einer 0,001 %igen Formaldehydlösung befanden, gelang, eine Stärkebildung bei Lichtabschluß zu beobachten.

Bei den höheren Pflanzen studierten erst *Bokorny*[5], später *Assfahl*[6] *Treboux*[7] und *Bouilhac* und *Giustiniani*[8] die Wirkung des Formaldehyds; diese Untersuchungen ergaben aber keine derart positiven Resultate, daß man aus ihnen auf die Formaldehydassimilation schließen konnte.

Das Verfahren von *Grafe* und *Portheim*[9] bedeutet einen neuen Weg auf dem Gebiete der Formaldehydassimilationsuntersuchungen; die Autoren haben den Formaldehyd in Gasform so zu den Blättern gelangen lassen, daß die Versuchspflanzen sich in einer eine geringe Menge Formaldehyddämpfe enthaltenden Atmosphäre befanden. Sie stellten fest, daß die Pflanzen (Phaseolus vulgaris) den formaldehydhaltigen Luftraum gut vertragen und den Formaldehyd aufzunehmen imstande sind. Gleichzeitig führte *Bokorny*[10] auch ähnliche Versuche aus und fand, daß die Pflanzen (Kresse) in der Formaldehyddämpfe enthaltenden Atmosphäre länger am Leben blieben als in kohlensäurefreier Luft. Aus den Versuchen von *Grafe* und *Wieser*[11] geht hervor, daß die Formaldehydpflanzen, entgegen den Kontrollen

---

[1] *Th. Bokorny*, Ber. d. deutsch. bot. Ges. **6**, 116, 1888.

[2] *O. Loew*, Bot. Centralbl. **44**, 318, 1890.

[3] *Th. Bokorny*, Ber. d. deutsch. bot. Ges. **9**, 103, 1891.

[4] *Derselbe*, Plügers Arch. **125**, 467, 1908.

[5] *Derselbe*, Landwirtsch. Versuchsstat. **36**, 238, 1889.

[6] *Assfahl*, Dissertation, Erlangen 1893, zitiert aus der Arbeit von *H. Schroeder* (l. c.), S. 109.

[7] *Treboux*, Flora **92**, 73, 1903.

[8] *Bouilhac* und *Giustiniani*, C. r. **136**, 1155, 1903; zitiert aus *Schroeders* Arbeit (l. c.), S. 109.

[9] *V. Grafe* und *L. Portheim*, Österr. Bot.-Ztg. **59**, 19, 1909.

[10] *Th. Bokorny*, Pflügers Arch. **128**, 565, 1909.

[11] *V. Grafe* und *E. Wieser*, Ber. d. deutsch. bot. Ges. **27**, 431, 1909.

(Pflanzen in gewöhnlicher Luft) sich rascher und kräftiger entwickelten, und der Trockensubstanzgehalt der entwickelten Pflanzen im Verhältnis zu dem ursprünglichen Trockensubstanzgehalt der Samen bei den Formaldehydpflanzen eine geringere Verminderung (unter 12 Fällen in 8 Fällen) als bei den Kontrollen zeigte.

Aus diesen Untersuchungen kann man aber nur dann auf die Assimilation des Formaldehyds schließen, wenn man voraussetzt, daß der Formaldehyd auf die Atmung der Blätter nicht schädlich wirkt; denn im entgegengesetzten Falle kann der bei den Formaldehydpflanzen wahrnehmbare größere Trockensubstanzgehalt auch die Folge der herabgesetzten Atmung sein. Diesbezüglich sagen *Grafe* und *Wieser* das Folgende:

„Wenn man nicht an eine Depression der Atmung durch Formaldehyd und damit eine dauerndere Instandhaltung des Trockengewichts denken will, was mit den Erfahrungen mit Äther und anderen Stimulantien nicht übereinstimmen würde, kann man aus dieser Beobachtung wohl auf eine Trockensubstanzvermehrung auf Kosten von Formaldehyd schließen, welche jene aus Kohlensäure erreicht oder gar übertrifft."

Grafe[1] beschreibt in einer späteren Mitteilung, daß der Formaldehyd auf grüne Pflanzen nur in Gegenwart von Sonnenlicht wirkt; es waren bei seinen Untersuchungen, welche ohne Sonnenlicht durchgeführt wurden, keine Unterschiede zwischen den Formaldehyd- und Kontrollpflanzen wahrnehmbar.

Es sind demnach die im Dunkeln gehaltenen Pflanzen (Phaseolus vulgaris und multiflorus) nicht imstande, den Formaldehyd aufzunehmen. Er führte Versuche auch in solcher Richtung durch, ob andere Verbindungen wie z. B. Acetaldehyd, Salicylaldehyd, Benzaldehyd, Essigsäure usw. eine ähnliche Wirkung wie der Formaldehyd ausüben können; die Resultate waren in jedem Falle negativ, bzw. verhinderten die oben erwähnten Substanzen stark die Entwicklung der Pflanzen. Sehr interessant ist *Grafes* Beobachtung, daß er in den Formaldehydpflanzen Stärke überhaupt nicht, oder nur kaum nachweisen konnte; reduzierenden Zucker enthielten sie aber viel mehr als die entsprechenden Kontrollpflanzen.

Baker[2] studierte eingehend die Wirkung der Formaldehyddämpfe auf den Trockensubstanzgehalt der Keimpflanzen von *Sinapis alba*, ohne daß es ihm gelungen wäre, die absolute Erhöhung des Trockensubstanzgehalts nachzuweisen. Er konnte nur so viel feststellen, daß die Trockensubstanz der Formaldehydpflanzen größer war als die der Kontrollpflanzen, aber kleiner als die der Samen, aus welchen sich die Pflanzen entwickelten.

---

[1] *V. Grafe*, Ber. d. deutsch. bot. Ges. **29**, 19, 1911.
[2] *Baker*, Ann. of Bot. **27**, 411, 1913, zitiert aus *H. Schroeders* Arbeit (l. c.), S. 113.



So ist z. B. Trockensubstanz der Samen = 100, Trockensubstanz der Formaldehydpflanzen = 84,67. Trockensubstanz der Kontrollpflanzen = 65,2. Hier liegt auch die Möglichkeit vor, daß die größere Trockensubstanz der Formaldehydpflanzen die Folge der die Atmung verhindernden Wirkung des Formaldehyds ist. Diese Untersuchungen wurden im Sonnenlicht durchgeführt, die im Dunkeln ausgeführten Untersuchungen beweisen überhaupt nichts, da die Trockensubstanz der Formaldehydpflanzen geringer war (38,48) als die der Kontrollpflanzen (56,5).

Wenn wir auch davon absehen, daß die Ursache des bei den Formaldehydpflanzen wahrgenommenen größeren Trockensubstanzgehaltes die verminderte Atmung sein kann, besitzen dennoch die oben besehriebenen Versuche von *Willstätter* und *Stoll*[1] keine beweisende Kraft für die Formaldehydhypothese, da sie bei Sonnenlicht durchgeführt wurden. Es ist möglich, daß die Pflanzen den dahingelangten Formaldehyd vorerst oxydieren und die entstandene Säure dann auf photosynthetischem Wege assimilieren; nach *Sabalitschkas*[2] Untersuchungen ist *Elodea canadensis* imstande, Ameisensäure in Gegenwart von Sonnenlicht zu assimilieren.

Die ersten Untersuchungen, bei denen die Assimilation des Formaldehyds *ohne Sonnenlicht* untersucht wurde, führte *Jacoby*[3] mit den Blättern von *Tropaeolum majus* aus. Auf Grund dieser Versuche können die Blätter Formaldehyd auch im Dunkeln aufnehmen, denn *Jacoby* fand, daß nach der Beendigung der Versuche bei jenen Blättern, durch welche er Formaldehyddämpfe enthaltende Luft längere Zeit durchleitete, die Trockensubstanz erheblich größer war als die bei den Kontrollblättern. So z. B. verlief auch ein solcher Versuch, wo der Trockensubstanzgehalt der Formaldehydblätter 14,5%, hingegen der von den Kontrollblättern 10% betrug. Gegen *Jacobys* Untersuchungen könnte der Einwand erhoben werden, daß der größere Trockensubstanzgehalt der Formaldehydblätter im Vergleich zu den Kontrollblättern nicht unbedingt eine Assimilation des Formaldehyds beweist, da ein solcher Unterschied auch dadurch entstehen kann, daß der Formaldehyd die Atmung der Blätter schädlich beeinflußt, d. h. daß der Trockensubstanzverlust der Formaldehydblätter während des Versuchs geringer ist als derjenige der Kontrollblätter. Im Endresultat kann also der Trockensubstanzgehalt der Formaldehydblätter größer sein, ohne daß diese auch nur etwas Formaldehyd aufgenommen hätten.

Jacoby[4] zieht in einer späteren Mitteilung diesen Umstand bereits in Betracht, als er direkte Trockensubstanzbestimmungen ausführte und darauf hinwies, daß die Trockensubstanz der mit den Formaldehydblättern parallel eingestellten Kontrollblätter kleiner war als die direkt gewonnenen Werte. Aber auch bei diesen Untersuchungen ist die eventuelle Einwirkung des Formaldehyds auf den Wassergehalt der Blätter nicht ausgeschlossen. Diese Möglichkeit kann so vermieden werden, daß

---

[1] *R. Willstätter* und *A. Stoll*, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, S. 164. Berlin 1918.

[2] *Th. Sabalitschka*, Ber. d. deutsch. pharm. Ges. **32**, 278, 1922.

[3] *M. Jacoby*, diese Zeitschr. **101**, 1, 1920.

[4] *Derselbe*, ebendaselbst **128**, 119, 1922.

man die Blätter für die Trockensubstanzbestimmung nicht nach Beendigung, sondern vor Beginn des Versuchs abwiegt, d. h. wenn man durch eine bekannte Menge von Blättern formaldehydhaltige bzw. bei der Kontrolle reine Luft durchleitet. Ob aus dem durch die Blätter aufgenommenen Formaldehyd Zucker oder Stärke entsteht, wurde von *Jacoby* nicht untersucht.

Vor kurzem befaßte sich *Sabalitschka*[1] ausführlich mit der Frage der Formaldehydassimilation und versuchte, mit groß angelegten Versuchen nachzuweisen, ob die Pflanzen imstande seien, den Formaldehyd durch ihre Blätter aufzunehmen und daraus Zucker bzw. Stärke zu bilden. *Sabalitschka* stellte seine Untersuchungen nicht mit gepflückten Blättern, sondern mit in die Erde eingesetzten ganzen Pflanzen (Tropaeolum majus L.) in einem solchen Apparat an, wo nur die oberirdischen Teile (Blatt, Stiel) der Pflanzen unter eine die Formaldehyddämpfe enthaltende Glasglocke gelangen, die Wurzeln — welche dem Formaldehyd gegenüber sehr empfindlich sind — blieben außerhalb der Glocke. Er stellte die Versuche parallel an, d. h. er leitete durch die Pflanzen in der einen Glocke formaldehydhaltige und durch die andere Glasglocke reine Luft; nach Beendigung der Durchleitung bestimmte er vorerst die Trockensubstanz der abgeschnittenen frischen Blätter, pulverisierte nachher die ausgetrockneten Blätter und gebrauchte das gewonnene Blattpulver zur Bestimmung des Zuckers und der Stärke.

Bei *Sabalitschkas* Untersuchungen bedeutet die Differenz zwischen dem Trockensubstanz-, Zucker- und Stärkegehalt der Formaldehyd- und Kontrollpflanzen die Menge der aus dem aufgenommenen Formaldehyd entstandenen Trockensubstanz des Zuckers und der Stärke. In jenem Falle aber, wenn der Formaldehyd auf die Atmung der Blätter abschwächend wirkt (was sehr wahrscheinlich ist), kann man es auch als Erfolg der herabgesetzten Atmung erklären, daß die Formaldehydblätter mehr Trockensubstanz, Zucker und Stärke enthalten als die Kontrollblätter; es kann also eine Differenz zwischen den Formaldehyd- und Kontrollpflanzen hervortreten, ohne daß von dem Formaldehyd auch etwas assimiliert wurde. Auf die aus Formaldehyd entstandenen Mengen der Trockensubstanz, des Zuckers und der Stärke kann man sicher schließen, wenn man anfangs (vor dem Versuche) den Trockensubstanzgehalt (Zucker und Stärke) der Versuchspflanzen bestimmt und diesen von der in den Formaldehydpflanzen gefundenen Trockensubstanzmenge (Zucker und Stärke) abzieht.

An den Umstand, daß der Formaldehyd die Atmung der Blätter beeinflussen kann, dachte *Sabalitschka* auch, als er in einer seiner Mitteilungen[2] das Folgende sagt: „Es könnten nun die Einwände gemacht werden, der Formaldehyd habe bei meinen Versuchen irgend eine Reizwirkung ausgeübt, oder er habe umgekehrt die Tätigkeit der Enzyme,

---

[1] *Th. Sabalitschka*, Ber. d. deutsch. pharm. Ges. **32**, 278, 1922; *Th. Sabalitschka* und *H. Riesenberg*, diese Zeitschr. **144**, 545, 551, 1924.
[2] *Th. Sabalitschka*, diese Zeitschr. **148**, 370, 1924.



welchen der Abbau der Kohlehydrate im Pflanzenkörper obliegt, unterbunden, man könnte auf die eine oder andere Weise den höheren Gehalt der in einer Formaldehydatmosphäre sich befindenden etiolierten Pflanzen erklären wollen." Diese Frage dachte *Sabalitschka* derart zu lösen, daß er die Wirkung des Formaldehyds auf die Keimung verschiedener Samen und auf die alkoholische Gärung studierte, und die gewonnenen Resultate einfach auf die Atmung der Blätter übertrug, als er das Folgende schrieb: „Die geringe Verzögerung, welche die Konzentrationen von weniger als 0,05% bei der Hefegärung bewirkt hatten, läßt darauf schließen, daß auch der Abbau des Zuckers und der Stärke in der mit Formaldehyd in der Atmosphäre ernährten Pflanze, bei der wir im Zellsaft einen Formaldehydgehalt von weniger als 0,055% fanden, höchstens unerheblich verzögert wird; der bedeutend höhere Gehalt des Zuckers und der Stärke bei den mit Formaldehyd behandelten Pflanzen ist *nicht* durch eine so geringe Verzögerung des Abbaues zu erklären."

Jedenfalls ist sonderbar, weshalb *Sabalitschka* die Wirkung des Formaldehyds unmittelbar auf die CO_2-Ausscheidung der Tropaeolum-Blätter nicht untersuchte.

Bezüglich der Stärke- und Zuckerbestimmung bemerkt *Sabalitschka* wie folgt: „Die von Natur aus in den Pflanzen vorhandenen höheren Polymerisationsprodukte des Formaldehyds sind teils wasserlöslich, so die Zuckerarten, teils in Wasser unlöslich, so die Stärke. Daher wurde bei unseren Untersuchungen die Bestimmung der in Wasser nicht löslichen Polymeren wie eine Stärkebestimmung durchgeführt und der dabei erhaltene Wert auf Glucose einerseits, auf Stärke andererseits berechnet. Ob die so gefundenen Werte in der Tat auch ausschließlich der Glucose und der Stärke entsprechen, darüber wollen wir noch nicht entscheiden."

Ob aus dem durch die Blätter aufgenommenen Formaldehyd in der Tat Stärke entsteht, wird in *Sabalitschkas* Mitteilungen nicht erwähnt. Da er stärkefreie Blätter zu seinen Untersuchungen verwendete, hätte man sich sehr leicht durch eine einfache qualitative Probe von dem Entstehen der Stärke überzeugen können. Es ist aber sehr wahrscheinlich, daß bei *Sabalitschkas* Untersuchungen aus dem Formaldehyd keine Stärke entstand (siehe *Grafes*[1] und unsere eigenen späterhin bekanntgegebenen Untersuchungen), und so kann man von in Zahlen ausgedrückten Stärkewerten in solchen Fällen nicht sprechen, wenn die Stärke als solche überhaupt nicht vorhanden ist.

Wenn der durch die Blätter aufgenommene Formaldehyd den Trockensubstanz- bzw. Zucker- und Stärkegehalt der Blätter steigert, dann muß der Trockensubstanzzuwachs mit dem Zucker- und Stärkezuwachs wenigstens annähernd übereinstimmen. Betrachtet man von diesem Standpunkte aus *Sabalitschkas* Resultate[2], so ergibt sich folgendes:

[1] *V. Grafe*, l. c.

[2] *Th. Sabalitschka*, Ber. d. deutsch. pharm. Ges. **32**, 278, 1922; *Th. Sabalitschka* und *H. Riesenberg*, diese Zeitschr. **144**, 545, 1924.

Trockensubstanzzuwachs	Stärke- und Zuckerzuwachs
auf 100 g frische Formaldehydblätter berechnet	
5,6 g	1,20 g
1,2 g	0,87 g
6,2 g	0,96 g
1,3 g	1,48 g
2,3 g	1,65 g
2,2 g	0,46 g

Aus diesen Daten ist ersichtlich, daß die Differenz zwischen dem Trockensubstanzzuwachs und dem Stärke- + Zuckerzuwachs mit Ausnahme von drei Fällen (1,3, 1,48; 2,3, 1,65; 1,2, 0,87) eine sehr große ist; es macht die Stärke + Zucker der aus Formaldehyd entstandenen Trockensubstanz in zwei Fällen (2,2, 0,46; 5,6, 1,20) 21 %, in einem Falle 15,5% aus. In einem Falle ist Stärke + Zucker (0,2, 0,48) mehr als das Doppelte der Trockensubstanz. Infolgedessen steht noch zur Entscheidung, welche Verbindungen außer Zucker und Stärke aus Formaldehyd in den Blättern entstehen.

Kürzlich untersuchte *Sabalitschka*[1] bei einer Wasserpflanze (Elodea canadensis) die Wirkung des Formaldehyds. Man findet hier schon solche experimentellen Beweise der Formaldehydhypothese, daß, im Falle einer vorteilhaften Formaldehydkonzentration (0,024 %), der auf Trockensubstanz berechnete Stärkegehalt (?) der Formaldehydpflanzen größer war als der Stärkegehalt der Pflanzen vor dem Versuch, und zwar war der Stärkegehalt der Formaldehydpflanzen 21,9 % und der vor dem Versuch 19,2 %. In Verbindung mit diesen Versuchen stellte *Sabalitschka* noch fest, daß die 0,024 %ige Formaldehydkonzentration auf die Atmung der Pflanzen nicht schädlich wirkte, die 0,032 %ige Konzentration hingegen die Atmung zur Hälfte, sodann auf ein Achtel herabsetzte.

Aus dem Gesagten folgt, daß, was die experimentellen Beweise der *Bayer*schen Formaldehydassimilationshypothese bzw. die Fähigkeit der Pflanzen, durch ihre Blätter Formaldehyd aufzunehmen und diesen durch Vermehrung des Trockensubstanz- bzw. Kohlenhydratgehaltes als Nährsubstanz zu verwerten, anbetrifft, die angeführten Versuche — nicht jeden Zweifel behebend — die Gültigkeit der Formaldehydassimilationshypothese für die höheren Pflanzen beweisen. Deshalb entschlossen wir uns, in dieser Richtung mit Berücksichtigung jedes sich darbietenden Umstandes, welcher gegen die Beweiskraft der behandelten Versuche angeführt werden konnte, unsere Untersuchungen zu vollenden.

Im Laufe unserer Untersuchungen wollten wir uns vorerst darüber orientieren, ob in den stärkefreien und der Wirkung des

[1] *Th. Sabalitschka* und *H. Weidling*, diese Zeitschr. **172**, 545, 1926.



Formaldehyds ausgesetzten Blättern Stärke entsteht. Diese unter verschiedenen Umständen wiederholten Versuche führten zu dem Resultate, daß wir in den in der formaldehydhaltigen Atmosphäre unter Ausschluß von Sonnenlicht gehaltenen Blättern *nicht in einem einzigen Falle die Gegenwart von Stärke nachweisen konnten*; deshalb bestimmten wir bei unseren quantitativen (später bekanntzugebenden) Untersuchungen nur den Zuckergehalt der Blätter.

Bei diesen Untersuchungen machten wir jene interessante Beobachtung, daß es bei den aus dem Apparat herausgenommenen und ans Licht gebrachten Blättern die Stärke in den Formaldehydblättern bedeutend früher nachzuweisen gelang, als bei den auch im Dunkeln, aber in reiner kohlensäurefreier Luft aufbewahrten Kontrollblättern. Diese Wahrnehmung erklärten wir vorerst so, daß die Kondensierung des in den Formaldehydblättern entstandenen Zuckers zu Stärke durch die Gegenwart des Formaldehyds verhindert wurde, und diese hindernde Wirkung hörte dann auf, als wir die Blätter an die freie Luft brachten. Bald überzeugten wir uns jedoch davon, daß das Ausbleiben der Stärkereaktion nicht die Gegenwart des Formaldehyds verursache, denn auch die stärkefreien Blätter, welche in formaldehydhaltiger Atmosphäre bei Sonnenlicht standen, gaben viel früher eine kräftigere Stärkereaktion als die Kontrollblätter. Die Stärkebildung in den Kontrollblättern förderte nicht eine Atmosphäre, die mehr Kohlensäure enthielt als die gewöhnliche Luft. Bei solchen Blättern, welche im formaldehydhaltigen, aber kohlensäurefreien Luftraum dem Sonnenlicht ausgesetzt waren, beobachteten wir ebenfalls Stärkebildung, woraus folgt, daß die Stärkeentstehung in Formaldehydblättern sich nicht als eine Reizwirkung des Formaldehyds auf die CO_2-Assimilation erklären läßt. Wir führten noch Untersuchungen aus, bei denen die Blätter sich in solchem formaldehydhaltigen Raume befanden, aus welchem wir die Luft auspumpten; in diesem Falle konnten wir in den Blättern Stärke nicht nachweisen; dies scheint darauf hinzuweisen, daß bei der Stärkebildung in den Formaldehydblättern außer dem Sonnenlicht auch der Sauerstoff eine Rolle spielt. Zur weiteren Aufklärung dieser Erscheinungen sind Versuche im Gange.

Wir verwendeten zu unseren Untersuchungen nicht ganze Pflanzen wie *Sabalitschka*, sondern nur Blätter, und zwar die Blätter von *Tropaeolum majus*, welche Pflanze zu diesem Zwecke am geeignetsten ist. Gegen die Anwendung der ganzen Pflanzen spricht einerseits der Umstand, daß derartige Versuche kompliziertere Einrichtungen erfordern, andererseits läßt sich vermuten, daß die in den Blättern entstandenen Assimilationsprodukte nicht bis zur Beendigung des Versuches in den Blättern bleiben, sondern inzwischen in den

Stengel bzw. in die Wurzel wandern können; durch die Untersuchung der Wurzeln und Stengel würden die Versuche zu kompliziert werden.

Aus den mitgeteilten Versuchsergebnissen der Tabelle I geht als Wichtigstes hervor, daß der Trockensubstanzgehalt der Formaldehydblätter nicht nur größer als derjenige der Kontrollblätter ist, sondern auch größer als der vor der Einstellung des Versuches bestimmte sogenannte Anfangstrockensubstanzgehalt der Versuchsblätter.

Diese Beobachtung weist jedenfalls darauf hin, daß durch die Formaldehydassimilation mehr Trockensubstanz entsteht, als während der Atmung der Blätter verbraucht wird. Die Differenz zwischen der Trockensubstanz der Versuchs- und Kontrollblätter ergibt die Menge der in der reinen Luft veratmeten Trockensubstanz; ist es bekannt, um wieviel der Formaldehyd die CO_2-Ausscheidung der Blätter vermindert, dann kann der durch die Atmung verursachte Trockensubstanzverlust der Formaldehydblätter berechnet werden; wird diese Menge zu der Differenz zwischen der Trockensubstanz der Versuchs- und Formaldehydblätter addiert, ergibt sich die genaue Menge der durch die Formaldehydassimilation entstandenen Trockensubstanz.

Aus den Daten der Tabelle II kann ausgerechnet werden, daß der Formaldehyd im Mittelwert und abgerundet mit 50% die CO_2-Ausscheidung der Blätter vermindert, man muß also die 50% der zwischen der Trockensubstanz der Versuchs- und Kontrollblätter sich zeigenden Differenz zu der Trockensubstanzdifferenz der Versuchs- und Formaldehydblätter addieren, um die aus dem durch die Blätter aufgenommenen Formaldehyd entstandene Trockensubstanzmenge bekommen zu können. Diese Daten befinden sich in der letzten Rubrik der Tabelle I.

Die Bestimmungen des Gesamtzuckergehalts in den bei den Trockensubstanzbestimmungen gewonnenen ausgetrockneten Blättern führten zu den in der Tabelle III beschriebenen Resultaten. Aus diesen Resultaten ist ersichtlich, daß der Zuckergehalt der Formaldehydblätter nicht nur größer als der der Kontrollblätter, sondern auch als der Anfangszuckergehalt der Blätter ist, was sodann jeden Zweifel ausschließend beweist, daß in den Blättern aus dem aufgenommenen Formaldehyd Zucker entsteht. Die Berechnung der durch die Formaldehydassimilation entstandenen Zuckermenge geschah mit der Berücksichtigung der bei der Trockensubstanz ausführlich erwähnten Umstände. Die Trockensubstanz- und Zuckermenge vergleichend, kann festgestellt werden, daß der entstandene Zucker im Mittelwert 21,6% der Trockensubstanz ausmacht (Minimum 15,7%, Maximum 27,5%). Weitere Untersuchungen müssen entscheiden, aus welcher Verbindung (Verbindungen ?) die größere Hälfte der aus Formaldehyd entstandenen Trocken-

substanz besteht; so viel ist jedenfalls sicher, daß diese Verbindung im Wasser unlöslich und keine Stärke ist. *Sabalitschkas* Untersuchungen machen es wahrscheinlich, daß diese Verbindung irgend ein höheres — vielleicht zwischen Zucker und Stärke stehendes — Kohlenhydrat ist. Die Untersuchungen, welche zur Entscheidung dieser Frage dienen, sind unsererseits im Gange.

Bei unseren bis jetzt bekanntgegebenen Untersuchungen gingen wir derart vor, daß wir zu den Trockensubstanzbestimmungen die Blätter am Ende der Versuche abwogen, was insofern getadelt werden kann, wenn die Ursache der wahrgenommenen Differenzen auch der verschiedene Wassergehalt der Versuchs- und Formaldehydblätter sein könnte. Es ist leicht denkbar, daß der Wassergehalt der Blätter durch die Wirkung des Formaldehyds sich verringert, und so kann im Endresultat die Erhöhung des Trockensubstanzgehaltes bei den Formaldehydblättern eintreten, ohne daß die Blätter auch irgendetwas vom Formaldehyd assimiliert hätten. Um diesen gerechten Zweifel zu benehmen, haben wir von vornherein Versuche mit abgewogenen Blättern durchgeführt, d. h. wir haben zu den Trockensubstanzbestimmungen die ganze Menge der zu den Versuchen verwendeten Formaldehyd- und Kontrollblätter benutzt. Aus den Daten der Tabellen IV und V ist ersichtlich, daß die Untersuchungen, welche wir mit im voraus abgewogenen Blättern durchführten, auch zu dem schon bekannten Resultat führten. Es können demnach die zwischen den Trockensubstanz- und dem Zuckergehalt bestehenden Differenzen der Versuchs- und Formaldehydblätter nicht mit dem verschiedenen Wassergehalt der Blätter erklärt werden.

Es kann da noch jene Frage auftauchen, ob der Formaldehyd die einzige gasförmige Verbindung ist, welche die Blätter aufnehmen und in Zucker umwandeln können. Die Reihe der experimentellen Beweise der Formaldehydassimilationshypothese möchte jedenfalls eine entscheidende Wichtigkeit besitzen, wenn es sich erweisen würde, daß eine den Eigenschaften des Formaldehyds nahestehende Verbindung sich anders verhält als der Formaldehyd, d. h. daß die Blätter nicht imstande sind, sie als Nährsubstanz zu verwerten. Als solche Verbindung kann in erster Reihe der Acetaldehyd erwähnt werden, welcher eine sehr wichtige Rolle nicht nur in dem Stoffwechsel der höheren Pflanzen, sondern im allgemeinen in dem Stoffwechsel der lebenden Organe spielt.

Grafe[1] hat nachgewiesen, daß der Acetaldehyd — entgegen dem Formaldehyd — die Entwicklung der Pflanzen stark verhindert; aus den mit

---

[1] *V. Grafe*, l. c.

Acetaldehyd durchgeführten Untersuchungen *Bakers*[1], welche den schon erwähnten Formaldehydversuchen ähnlich ausgeführt wurden, kann man weder in negativem noch in positivem Sinne auf die Acetaldehydassimilation schließen. Jüngst führten *Sabalitschka* und *Weidling*[2] mit der *Wasserpest* (*Elodea canadensis*) Untersuchungen aus, wonach diese Pflanzen fähig sind, den zur Nährlösung hinzugegebenen Acetaldehyd aufzunehmen und zu Stärke umzuwandeln. Bei den *in Gegenwart des Sonnenlichts* durchgeführten Untersuchungen zeigte der Anfangsstärkegehalt der Pflanzen durch die Wirkung des Acetaldehyds eine Erhöhung; diese bezieht sich jedoch nicht auf die im Dunkeln ausgeführten Versuche. Die Verfasser erwähnten gar nichts darüber, ob es ihnen überhaupt gelungen ist, die Stärkeentstehung aus Acetaldehyd mit der Jodreaktion nachzuweisen. Sonst sind zahlreiche solche Verbindungen bekannt[3] (Glycerin, Aminosäure, verschiedene Zucker usw.), welche aus ihren wässerigen Lösungen durch die in die Lösungen gebrachten Algen und abgeschnittenen Blätter aufgenommen werden und aus denselben Stärke bilden können, ohne daß jene Verbindungen als die Zwischenprodukte der CO_2-Assimilation in Betracht gezogen werden könnten.

Die Ergebnisse der Acetaldehydversuche, welche ähnlich wie die Formaldehydversuche durchgeführt wurden, stellen wir in der Tabelle VI zusammen. Aus den Daten dieser Tabelle ist ersichtlich, daß der Trockensubstanzgehalt der Versuchsblätter größer ist als derjenige der Acetaldehydblätter, d. h., daß der zu den Blättern in gasförmigem Zustande gelangte Acetaldehyd — im Gegensatz zum Formaldehyd — den Trockensubstanzgehalt der Versuchsblätter nicht erhöhte; demzufolge können also die Blätter den dem Formaldehyd am nächsten stehenden Acetaldehyd nicht als Nährsubstanz verwerten, woraus man sodann mit Recht auf die Sonderstellung des Formaldehyds vom Standpunkte der Assimilation aus schließen kann. Diese negativen Versuche mit Acetaldehyd haben eine besondere Bedeutung, da sie als ein schlagender Beweis der Formaldehydassimilationshypothese betrachtet werden können. Wenn wir den Trockensubstanzgehalt der Acetaldehyd- und Kontrollblätter vergleichen, finden wir, daß die Trockensubstanz der Acetaldehydblätter größer ist als die der Kontrollblätter; dies kann aber nicht auf die Assimilation des Acetaldehyds, sondern auf die schädliche Wirkung des Acetaldehyds auf die Atmung der Blätter zurückgeführt werden. Nicht nur durch Acetaldehyd, sondern auch durch die Wirkung einer solchen Verbindung, welche auf die Atmung der Pflanzen schädlich wirkt, wie z. B. das Toluol, welches überhaupt in gar keine Beziehung mit der Assimilation gebracht werden kann, sind ähnliche Differenzen wahrnehmbar, wie das unsere gleichfalls in der Tabelle VI mitgeteilten Versuchsdaten

[1] *Baker*, l. c.
[2] *Th. Sabalitschka* und *H. Weidling*, diese Zeitschr. **176**, 210, 1926.
[3] *H. Schroeder*, l. c., S. 135.

tatsächlich beweisen. Die Ergebnisse der mit Acetaldehyd-, Toluol-, Kontroll- und Versuchsblättern durchgeführten Zuckerbestimmungen (Tabelle VII) bekräftigen ebenso die oben erwähnten Ergebnisse bezüglich der Acetaldehydassimilation. Aus unseren mit Acetaldehyd und Toluol ausgeführten Versuchen ist jedenfalls ersichtlich, daß diejenigen bisherigen Versuche, welche aus der Differenz zwischen dem Trockensubstanz-, Zucker- oder Kohlenhydratgehalt der Formaldehyd- und Kontrollpflanzen auf die Assimilation des Formaldehyds zu schließen trachteten, keine sichere Beweiskraft haben konnten, da diese Unterschiede die Wirkung aller solcher zu den Blättern hinzugelangten gasförmigen Verbindungen darstellen, welche abschwächend auf die Atmung der Blätter wirken.

I. Experimenteller Teil.

Die Anordnung der Versuche.

Die Anordnung unserer Versuche war ähnlich der von *M. Jacoby* zu seinen mit Tropaeolumblättern durchgeführten Formaldehydassimilationsuntersuchungen angewandten. Zu den Versuchen wurden solche Tropaeolumblätter verwendet, die in Wasser gestellt so lange in einem dunklen Zimmer gehalten wurden, bis sie stärkefrei geworden waren. Das Verschwinden der Stärke wurde mit der Jodreaktion kontrolliert. 1 bis 2 Tage waren zum Verschwinden der Stärke aus den Blättern notwendig. Ein kleinerer Teil der stärkefreien Blätter wurde zur Bestimmung der Anfangstrockensubstanz der Blätter (d. h. vor dem Versuch) verwendet und mit den übrigen wurden die Versuche sofort eingestellt.

Es wurden in runde Korkplatten (mit 5 bis 10 cm Durchmesser und ½ cm Dicke) feine Löcher gebohrt, in diese die Tropaeolum-Blätter mit ihren Stielen gesteckt und mit geschmolzenem Paraffin ringsum fixiert. Zu einem Versuch wurden 20 bis 30 Blätter angewendet. Die mit den Blättern versehenen Korkplatten kommen in runde Glasgefäße von entsprechender Dimension, und die Gefäße enthalten so viel Wasser, daß die Enden der Blätterstiele unter das Wasser tauchen. Diese Glasgefäße wurden in einen verschließbaren größeren Glaszylinder eingestellt, auf dessen oberen Teil ein Einleitungs- und auf dessen unteren Teil ein Ableitungsrohr montiert wurde. Das Einleitungsrohr des Glaszylinders war bei dem Formaldehydversuch mit einer 4%ige Formaldehydlösung enthaltenden Waschflasche unmittelbar verbunden, die Waschflasche stand mit einem mit Natronkalk gefüllten Rohr, dieses wieder mit einem Gasometer in Verbindung, aus dem man Luft durch den Apparat leiten konnte. Die durch die 4%ige Formaldehydlösung durchströmende Luft riß ständig Formaldehyd-

dämpfe mit sich, und so passierte den die Blätter enthaltenden Glaszylinder während des ganzen Versuchs kleine Mengen Formaldehyd enthaltende kohlensäurefreie Luft. Mit dem Formaldehydversuch wurden stets parallel unter ganz ähnlichen Umständen Kontrollversuche angestellt mit dem Unterschiede, daß statt der Formaldehydwaschflasche eine mit Wasser gefüllte Waschflasche eingeschaltet wurde, und so durchströmte reine kohlensäurefreie Luft den die Blätter enthaltenden Glaszylinder. Die Versuche wurden im Dunkeln bei Zimmertemperatur (19 bis 21°) durchgeführt; die in der Tabelle I mitgeteilte, anhaltende Versuchsdauer ist so zu deuten, daß die Luftdurchleitung während der Nacht ausblieb.

Trockensubstanzbestimmung.

Nach Ablauf der Versuchsdauer wurde die Trockensubstanzbestimmung in den aus dem Glaszylinder entnommenen Blättern sowie die Anfangstrockensubstanzbestimmung der Blätter vor dem Versuch derartig durchgeführt, daß dreimal genau 2 bis 3 g stiellose Blätter in Wägegläschen mit gut eingeschliffenem Stöpsel abgewogen und im Wasserdampftrockenschrank bis zum konstanten Gewicht getrocknet wurden. Von den aus dem Apparat herausgenommenen Blättern wurden immer drei bis vier Blätter zum Stärkenachweis angewendet. So sind in der Tabelle I, die in den anderen Tabellen beschriebenen Werte Mittelwerte von mindestens drei gut übereinstimmenden Bestimmungen.

Tabelle I.

Nr.	Versuchszeit in Stunden	Trockensubstanz in %			Aus Formaldehyd entstandene Trockensubstanz in %	Stärkereaktion
		a Versuchsblätter	b Formaldehydblätter	c Kontrollblätter	$b - a + \frac{a - c}{2}$	
1	26	13,84	14,50	13,77	0,70	negativ
2	28	13,98	14,42	13,84	0,51	
3	29	13,01	13,53	12,45	0,80	
4	30	13,46	14,10	13,03	0,86	
5	30	13,55	14,19	13,46	0,69	
6	30	13,36	14,76	13,42	1,40	
7	120	14,52	15,24	13,63	1,17	

Die Untersuchung der Formaldehydwirkung auf die Blätteratmung.

Es wurde auf dem Boden zweier steriler 500-ccm-Saugflaschen ein Wattebausch in 2 bis 3 cm dicker Schicht verteilt, und in der einen Flasche die Watteschichten mit 20 ccm destilliertem Wasser, in der anderen mit 20 ccm 4%iger Formaldehydlösung gleichmäßig durchfeuchtet. Auf der darüber gelegten trockenen Watteschicht wurden die vorher

abgewogenen Tropaeolumblätter ausgestreut und die Flaschen mit einem gut schließenden, mit einem bis zum Boden des Kolbens reichenden rechtwinklig gebogenen Glasrohr versehenen Gummistopfen verschlossen. Auf das Seitenrohr der Saugflasche und auf das Ende des rechtwinklig gebogenen Rohres wurden dickwandige Kautschukröhren gezogen, mit Metallklemmen luftdicht verschlossen und die auf diese Weise vorbereiteten Saugflaschen im Dunkeln (bei Zimmertemperatur) stehengelassen. Nach Ablauf der Versuchsdauer wurden die Kolben mit eine bekannte Menge Barytwasser enthaltenden *Bodnár*schen Adsorptionsröhren[1] verbunden, die durch die Blätter ausgeschiedene Kohlensäure mit kohlensäurefreiem Luftstrom behutsam in das Barytwasser hinübergetrieben und das nicht verbrauchte Barytwasser mit Oxalsäure zurücktitriert.

Tabelle II.

Nr.*	Versuchszeit in Stunden	Zum Versuch gebrauchte Blattmenge g		Durch die Blätter ausgeschiedene CO_2 mg		Ausgeschiedene CO_2 auf 100 g Blätter berechnet mg	
		Kontrollversuch	Formaldehydversuch	Kontrollversuch	Formaldehydversuch	Kontrollversuch	Formaldehydversuch
1	44	3,434	3,555	47,5	29,5	1383,2	829,8
2	24	2,137	2,125	24,6	12,3	1151,1	578,8
3	24	2,123	2,179	23,8	9,1	1121,0	417,6
4	29	3,487	3,415	35,2	25,1	1009,4	734,9
5	25	2,278	2,142	23,1	10,3	1014,0	480,9
6	25	2,126	2,140	12,1	5,3	569,2	277,5
7	25	1,939	1,953	10,1	5,7	520,9	291,7

* 1 bis 5 Stärke enthaltende frische Blätter, 6 und 7 stärkefreie Blätter.

Zuckerbestimmung. Es wurde die ganze Menge der bei der Trockensubstanzbestimmung gewonnenen ausgetrockneten Blätter pulverisiert, das Blattpulver in einen 100-ccm-Erlenmeyerkolben gebracht, 40 ccm Wasser daraufgeschüttet, zur Ausfällung der nicht zuckerartigen aber *Fehling*sche Lösung reduzierenden Verbindungen 2 ccm 20%ige Mercuronitratlösung[2] hinzugegeben und die Mischung unter öfterem Schütteln bei Zimmertemperatur 2 Stunden hindurch stehengelassen. Diese wurde nachher durch Faltenfilter in einen 100-ccm-Meßkolben filtriert, die auf dem Filter zurückgebliebene Substanz mit Wasser nachgewaschen, zum Filtrat eine bis zwei Messerspitzen Kochsalz hinzugefügt, gut durchgeschüttelt, ergänzt und nach Zusammenballen des Niederschlags (Hg_2Cl_2)

---

[1] Noch nicht publiziert.
[2] *A. Ackermann* und *H. Johansson*, Zeitschr. f. Pflanzenzucht **5**, 349, 1917.

abfiltriert. Es wurden 50 ccm des Filtrats mit Salzsäure angesäuert, auf dem Wasserbad ½ Stunde lang am Rückflußrohr gekocht, mit Lauge neutralisiert, der Zuckergehalt der Lösung nach *Bertrand* bestimmt und als Glucose berechnet.

Tabelle III.

Nr.	Gesamtzucker in %						Aus Formaldehyd entstandener Zucker auf frische Blätter berechnet	Aus Formaldehyd entstandene Trockensubstanz
	Versuchsblätter		Formaldehydblätter		Kontrollblätter			
	in Trockensubstanz	in frischen Blättern	in Trockensubstanz	in frischen Blättern	in Trockensubstanz	in frischen Blättern	in %	in %
1	7,63	1,06	7,97	1,17	7,54	1,04	0,12	0,70
2	10,35	1,45	11,03	1,57	10,24	1,42	0,14	0,51
3	10,43	1,36	10,95	1,48	10,46	1,31	0,15	0,80
4	10,16	1,37	10,81	1,52	9,79	1,28	0,20	0,86
5	10,21	1,38	10,93	1,55	9,92	1,34	0,19	0,69
6	9,30	1,24	10,63	1,57	9,30	1,25	0,33	1,40
7	10,37	1,50	11,17	1,70	9,41	1,28	0,31	1,17

Die Tabelle IV enthielt die Resultate derjenigen Versuche, welche wir mit vor dem Versuch abgewogenen Blättern vollführten. Wir gebrauchten bei diesen Versuchen die Blätter samt den Stielen zu den Trockensubstanzbestimmungen, und die Versuchszeit war in jedem Falle 30 Stunden.

Tabelle IV.

Nr.	Versuchsblätter			Formaldehydblätter			Kontrollblätter			Aus Formaldehyd entstandene Trockensubstanz in %	Aus Formaldehyd entstandener Zucker auf frische Blätter berechnet in %
	Trockensubstanz in %	Gesamtzucker in %		Trockensubstanz in %	Gesamtzucker in %		Trockensubstanz in %	Gesamtzucker in %			
		in Trockensubstanz	in frischen Blättern		in Trockensubstanz	in frischen Blättern		in Trockensubstanz	in frischen Blättern		
1	15,23	10,25	1,56	15,87	11,53	1,83	13,05	9,06	1,18	1,73	0,45
2	15,28	9,60	1,47	15,98	10,92	1,75	13,05	9,42	1,23	1,82	0,40
3	14,44	9,37	1,35	15,42	10,16	1,57	13,85	8,77	1,21	1,28	0,29
4	14,41	9,34	1,35	15,26	10,10	1,55	13,65	8,92	1,22	1,23	0,27

Versuche mit Acetaldehyd und Toluol.

Diese Versuche wurden ähnlich wie die schon bekanntgegebenen Formaldehydversuche durchgeführt, mit dem Unterschiede, daß wir in die Waschflasche statt Formaldehyd 4% Acetaldehyd bzw. 4% Toluol enthaltendes Wasser gaben. In den in der Tabelle V wiedergegebenen Experimenten wurden die Blätter bei den Versuchen 1, 2, 5 und 6 nach Beendigung der Versuche, und bei den Versuchen 3 und 4 vor dem Versuche zur Trockensubstanzbestimmung abgewogen. Die

Tabelle V.

Nr.	Versuchszeit in Stunden	Trockensubstanz in %		
		Versuchsblätter	Acetaldehydblätter	Kontrollblätter
1	30	14,19	13,88	13,39
2	30	14,75	14,07	13,27
3	30	14,63	14,23	13,95
4	30	14,90	14,22	13,96
			Toluolblätter	
5	28	14,25	14,34	13,60
6	28	14,93	14,67	13,80

Tabelle VI.

Nr.	Gesamtzucker in %					
	Versuchsblätter		Acetaldehydblätter		Kontrollblätter	
	in Trockensubstanz	in frischen Blättern	in Trockensubstanz	in frischen Blättern	in Trockensubstanz	in frischen Blättern
1	10,74	1,52	10,16	1,41	9,43	1,26
2	10,30	1,52	10,14	1,43	9,82	1,30
3	10,34	1,51	10,38	1,48	10,00	1,40
4	10,54	1,57	10,09	1,43	10,18	1,42
			Toluolblätter			
5	10,82	1,54	10,86	1,56	10,20	1,39
6	10,86	1,62	10,78	1,58	10,25	1,41

Tabelle VI enthält die Ergebnisse der mit den Acetaldehyd- und Toluolblättern durchgeführten Zuckerbestimmungen.

Versuche über Stärkeentstehung in Formaldehydblättern.

Zu den Versuchen wurden in jedem Falle ganz stärkefreie *Tropaeolum*blätter angewendet. Die Jodreaktion wurde zum Nachweis der Stärke so gebraucht, wie es *Julius Sachs*[1] zu diesem Zweck zum ersten Mal empfahl.

1. *18. September 1925.* Die aus dem Apparat samt dem Gefäß herausgehobenen Formaldehyd- und Kontrollblätter wurden von 11 Uhr 30 Minuten bis 14 Uhr 30 Minuten der Wirkung von direktem Sonnenlicht ausgesetzt und in einstündigen Intervallen je ein Blatt auf Stärke untersucht.

	Stärkereaktion		
	nach 1 Std.	nach 2 Std.	nach 3 Std.
Formaldehydblätter	positiv	positiv	positiv
Kontrollblätter	negativ	negativ	negativ

[1] *W. Detmer*, Das pflanzenphysiologische Praktikum. S. 38. Jena 1895.

2. *5. Oktober 1925.* Die Wiederholung des vorherigen Versuches führte zu ähnlichen Resultaten, und nach einer vierstündigen Beleuchtung konnte man auch schon in den Kontrollblättern Stärke nachweisen.

3. *17. August 1926.* Es wurden auf den Boden eines Exsikkators 20 ccm 4 %iger Formaldehydlösung, und in den anderen 20 ccm mit CO_2 gesättigten Wassers gegossen und die Tropaeolumblätter enthaltenden Glasgefäße hineingestellt. Die bedeckten Exsikkatoren waren 3 Stunden lang von 3 bis 6 Uhr der Wirkung des direkten Sonnenlichtes ausgesetzt.

	Untersucht	Stärkereaktion
Nach 1 Stunde:	2 Formaldehydblätter . . .	1 positiv, 1 negativ
„ 1 „	2 Kontrollblätter	2 negativ
„ 2 Stunden:	2 Formaldehydblätter . . .	2 positiv
„ 2 „	2 Kontrollblätter	1 schwach positiv, 1 negativ
„ 3 „	3 Formaldehydblätter . . .	3 positiv
„ 3 „	3 Kontrollblätter	3 schwach positiv

4. *21. August 1926.* Die Wiederholung des vorherigen Versuchs, die Dauer der Beleuchtung betrug 6 Stunden, von 12 bis 18 Uhr.

	Untersucht	Stärkereaktion
Nach 1 Stunde:	1 Formaldehydblatt	negativ
„ 1 „	1 Kontrollblatt	negativ
„ 4 Stunden:	2 Formaldehydblätter . . .	2 positiv
„ 4 „	2 Kontrollblätter	1 schwach positiv, 1 negativ
„ 6 „	2 Formaldehydblätter . . .	2 positiv
„ 6 „	2 Kontrollblätter	1 schwach positiv, 1 negativ

5. *25. August 1926.* Die Wiederholung des Versuchs 3. Sonnenlichtwirkung 7 Stunden, von 10 bis 17 Uhr.

	Untersucht	Stärkereaktion
Nach 4 Stunden:	2 Formaldehydblätter . . .	2 schwach positiv
„ 4 „	2 Kontrollblätter	2 negativ
„ 7 „	4 Formaldehydblätter . . .	4 positiv
„ 7 „	4 Kontrollblätter	3 schwach positiv, 1 negativ

6. *30. August 1926.* Die Wiederholung des Versuchs 3 mit dem Unterschied, daß ein zweiter Formaldehydexsikkator im Dunkeln gehalten wurde. Am Sonnenlicht 3 Stunden lang, von 12 bis 15 Uhr.

	Untersucht	Stärkereaktion
Nach 3 Stunden:	4 Formaldehydblätter . . .	2 positiv, 1 schwach positiv, 1 negativ
„ 3 „	4 im Dunkeln gehaltene Formaldehydblätter	4 negativ
„ 3 „	4 Kontrollblätter	4 negativ

7. *1. September 1926.* Bei diesem Versuche enthielten zwei Exsikkatoren 20 ccm 4%ige Formaldehydlösung, aus dem einen wurde die Luft herausgesaugt. Am Sonnenlicht 7 Stunden hindurch, von 11 bis 18 Uhr.

	Untersucht	Stärkereaktion
Nach 7 Stunden:	5 Formaldehydblätter . . .	3 positiv, 2 negativ
„ 7 „	4 Formaldehydblätter aus CO_2-freier Atmosphäre . . .	4 negativ

8. *5. September 1926.* Es wurde ein Teil von in formaldehydhaltiger Atmosphäre im Dunkeln 26 Stunden lang aufbewahrten Blättern ins Sonnenlicht gebracht und der andere Teil in einen Exsikkator gestellt, welcher konzentrierte Natronlauge enthielt. Es wurden also die Formaldehydblätter in kohlensäurefreier, reiner Luft der Sonnenlichtwirkung ausgesetzt. Sonnenlichtwirkung 6 Stunden, von 11 bis 17 Uhr.

	Untersucht	Stärkereaktion
Nach 6 Stunden:	5 Formaldehydblätter . . .	5 positiv
„ 6 „	5 Formaldehydblätter aus kohlensäurefr. Atmosphäre .	1 schwach positiv, 1 negativ

II.

Nachdem jeden Zweifel ausschließend bewiesen wurde, daß die grünen Blätter den zugefügten gasförmigen Formaldehyd zu Zucker zu kondensieren fähig sind, entsteht nun die Frage, ob die in den Blättern sich vollziehende Kondensation der Formaldehydmoleküle auf der Tätigkeit der lebenden Zellen oder auf einer Enzymwirkung beruht oder durch einen chemischen Vorgang zustande kommt.

Das Auftreten irgend einer als Zwischenprodukt supponierten Verbindung bei den biochemischen synthetischen Vorgängen kann bewiesen werden, wenn man, von dem vermutlichen Zwischenprodukt ausgehend, das Endprodukt der biochemischen Synthese mit Hilfe einfacher chemischer Verfahren aufbauen kann.

Dieser Beweis wurde auch bei dem Formaldehyd erbracht, denn bei der Aufstellung der *Bayer*schen Formaldehydassimilationshypothese diente der *Butlerow*sche Versuch als Beweis, daß aus Formaldehyd durch Wirkung des Kalkwassers eine zuckerartige Verbindung entsteht. *Emil Fischer*[1] wies nach, daß aus Formaldehyd α-Acrose entsteht (= d, l-Fructose), welche dann auch den in den Pflanzen vorkommenden Zucker (d-Fructose und d-Glucose) zu verwandeln vermag. Jüngst wiesen *Baly*[2] und seine Mitarbeiter nach, daß, wenn sie eine Formaldehydlösung der Wirkung von Strahlen mit 290 $\mu\mu$ Wellenlängen aussetzten, Hexose entsteht, und diese photochemische Synthese läßt sich durch Katalysatoren wie auch durch Chlorophyll beschleunigen.

---

[1] *E. Fischer*, l. c., und Ber. d. deutsch. chem. Ges. **23**, 370, 799, 2114, 2126, 1890.

[2] *E. Ch. C. Baly, J. M. Heilbron* und *W. F. Baker*, Journ. Chem. Soc. London **119**, 1023, 1921; **121**, 1078, 1922.

Für die Frage, wie die Kondensation des Formaldehyds in den Blättern zustande kommt, können wir eine Erklärung gewinnen, wenn wir das Schicksal des zu dem aus grünen Blättern bereiteten Brei zugesetzten Formaldehyds untersuchen.

Plancher und *Ravenna*[1] fanden, daß der zu den zerkleinerten Blättern zugesetzte Formaldehyd von diesem derartig gebunden wird, daß man nach Ablauf einiger Stunden denselben nicht mehr nachweisen konnte. Nach *Finckes*[2] Untersuchungen konnte man zu frischem und gekochtem Blattbrei (Rhabarber- und Roßkastanienblätter) bzw. zu chlorophyllfreiem Spargelbrei zugesetzte kleine Mengen Formaldehyds nach mehrstündigem Stehen schon nicht mehr nachweisen, was durch den Verfasser so erklärt wird, daß der Formaldehyd entweder zerfiel oder fixiert wurde. Aus diesen Untersuchungen zieht *Schroeder* den folgenden Schluß: „Man wird daher weder an eine Lebenserscheinung noch an einen enzymatischen Vorgang denken können, sondern eine rein chemische Bindung durch gewisse im Blatt vorhandene Substanzen anzunehmen haben (als solche kamen z. B. Eiweißstoffe in Frage).

Entgegen den oben erwähnten Untersuchungen, schien es ganz natürlich, daß der zur Lösung der Frage führende einzige richtige Weg der ist, wenn wir untersuchen, ob durch die Wirkung des zu den Blättern zugesetzten Formaldehyds sich der reduzierende Zuckergehalt des Breies erhöht.

Gleich beim Beginn unserer Untersuchungen konstatierten wir, daß zur Bestimmung des reduzierenden Zuckergehaltes des Blattbreies die *Fehling*sche Lösung in diesem Falle nicht verwendbar ist, da sie der Formaldehyd auch reduziert. *Neuberg* und *Reinfurth*[3] hatten festgestellt, daß zum Nachweis des Zuckers in der Acetaldehyd enthaltenden Lösung die mit K_2CO_3 und $KHCO_3$ bereitete, alkalische, sogenannte *Ost*sche[4] Kupferlösung besonders brauchbar ist, da diese Lösung von Acetaldehyd nicht reduziert wird. Wir versuchten auch die Anwendung der *Ost*schen Lösung und stellten fest, daß aus der mit Formaldehyd gekochten *Ost*schen Lösung Kupferoxydul sich gar nicht oder nur kaum abscheidet; zum Beweis erwähnen wir unsere folgenden qualitativen und quantitativen Untersuchungen:

Qualitative Untersuchungen.

1. 20 ccm Fehlinglösung + 5 ccm 4%iger Formaldehydlösung: starker Niederschlag.
2. 20 ccm Ostlösung + 5 ccm 4%iger Formaldehydlösung: kein Niederschlag.

[1] *H. Schroeder*, l. c., S. 97.
[2] *H. Fincke*, l. c.
[3] *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, diese Zeitschr. 92, 234, 1918.
[4] *H. Ost*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 23, 1035, 3003, 1890.

Quantitative Untersuchungen[1].

3. 20 ccm Ostlösung + 5 ccm 4%iger Formaldehydlösung: 0,2 ccm n/10 $KMnO_4$.
4. 20 ccm Ostlösung + 0,5 ccm Glucoselösung: 6,6 ccm n/10 $KMnO_4$.
5. 20 ccm Ostlösung + 0,5 ccm Glucose + 5 ccm 4%iger Formaldehydlösung: 6,65 ccm n/10 $KMnO_4$.

Demgemäß kann man die Ostlösung vorteilhaft zur Untersuchung derjenigen Frage anwenden, ob durch Formaldehyd der reduzierende Zuckergehalt des Blattbreies erhöht wird.

Bei unseren Untersuchungen wurden 5 g Tropaeolumblätter mit 2 bis 3 g *Merck*schen Quarzsplittern gut zerrieben, der gewonnene Blattbrei in eine Flasche von 100 ccm übertragen, die in der folgenden Zusammenstellung mitgeteilte Wasser- bzw. Formaldehydmenge hinzugegeben, gut durchgemischt und bei Zimmertemperatur stehengelassen. Bei jenen Untersuchungen, wo Formaldehyd nicht angewendet wurde, haben wir Toluol als Desinfektionsmittel gebraucht. Nach Ablauf der Versuchsdauer wurden 50 ccm Wasser und 2 ccm 20%iger Mercuronitratlösung hinzugefügt, nach einem ½ stündigen Stehen durch ein trockenes Faltenfilter in einen 100-ccm-Meßkolben filtriert, die auf dem Filter zurückgebliebene Substanz mit kaltem Wasser nachgewaschen, zum Filtrat 1 bis 2 Messerspitzen Kochsalz hinzugegeben, nach Ergänzung von dem ausgeschiedenen Mercurochlorid filtriert und 50 ccm des Filtrates (= 2,5 g Blattbrei) mit 20 ccm Ostlösung gekocht. Das ausgeschiedene Cu_2O wurde nach *Bertrand* titriert und auf Grund der in der Mitteilung von *Ost* angegebenen Tabelle als Glucose berechnet. Wir haben auch solche Versuche durchgeführt, bei welchen der Blattbrei vor Zugabe des Formaldehyds in einer Stöpselflasche am siedenden Wasserbade 15 Minuten lang erwärmt wurde; diese Untersuchungen gaben darauf Antwort, in welchem Maße die Kondensation des Formaldehyds auf die Wirkung irgend eines synthetisierenden Enzyms zurückgeführt werden kann.

Die mitgeteilten Daten beweisen, daß aus dem zu einem Blattbrei von Tropaeolum hinzugefügten Formaldehyd durch Enzymwirkung reduzierender Zucker entstand.

Jüngstens wies *H. Molisch*[2] mit Hilfe der leuchtenden Bakterien nach, daß das ausgetrocknete Blattpulver verschiedener Pflanzen (Klee, Kraut, Rettich, Spinat, Salat) auch imstande ist, durch Einwirkung des Lichtes CO_2 zu reduzieren bzw. aus ihm Sauerstoff zu entwickeln. Das Pulver der bei höherer Temperatur getrockneten oder etiolierten (chlorophyllfreien) Blätter entwickelte keinen Sauerstoff, demnach

[1] Das ausgeschiedene Cu_2O wurde nach *Bertrand* titriert.
[2] *H. Molisch*, Zeitschr. f. Bot. 18, 593, 1925.



Nr.	Zu je 5 g Blattbrei hinzugegeben		Versuchsdauer in Stunden	n/20 K Mn O_4 1 ccm = 3,18 mg Cu	Glucosegehalt in 5 g Blattbrei mg	Bemerkung
	H_2O ccm	4%ige Formaldehydlösung ccm				
1	2	5	0	6,6	13,1	
2	2	5	24	13,2	26,2	
3	2	5	48	19,8	39,4	
4	2	5	0	5,2	10,3	mit gekochtem Brei
5	2	5	24	6,6	13,1	mit gekochtem Brei
6	7	—	0	5,8	11,5	
7	7	—	0	5,0	9,9	mit gekochtem Brei
8	7	—	24	6,8	13,5	3 ccm Toluol
9	7	—	24	6,0	11,9	mit gekochtem Brei + 3 ccm Toluol
10	2	5	0	6,6	13,1	
11	2	5	24	13,0	25,8	
12	2	5	48	19,4	38,5	

kann also der erste Teil der Assimilation, die Reduktion der Kohlensäure, als ein solcher von dem lebenden Chloroplast unabhängig sich abspielender Vorgang betrachtet werden, wozu die Gegenwart von Chlorophyll und Licht notwendig ist. Auf Grund unserer Untersuchungen vollzieht sich die Kondensation des Formaldehyds zu Zucker, also der letzte Teil des Assimilationsvorganges beruht ebenfalls auf Enzymwirkung. Es ist nun fraglich, ob und in welchem Maße die Entstehung des Formaldehyds, d. h. der mittlere Teil der Assimilation als ein enzymatischer Vorgang qualifiziert werden kann.

Zurzeit sind von uns diejenigen Untersuchungen im Gange, welche auf die folgenden Fragen Antwort geben werden: 1. ob das Pulver ausgetrockneter Blätter auch imstande ist, den Formaldehyd zu Zucker zu kondensieren; 2. ob außer Formaldehyd noch solche Verbindungen existieren, welche durch Blattbrei oder Blattpulver gleichfalls zu Zucker kondensiert werden können; 3. ob außer den grünen Blättern auch andere pflanzliche Teile Formaldehyd kondensierende Enzyme enthalten; 4. was für ein Zucker bei der enzymatischen Kondensation des Formaldehyds entsteht.

Zur Frage nach der chemischen Zusammensetzung und den Eigenschaften des Blutes vor und nach der Fütterung des Tieres.

I. Mitteilung:

Wasserstoffionenkonzentration des Blutes und sein Gehalt an Chloriden, Zucker und Calcium.

Von

S. E. Ssewerin.

(Aus dem physiologischen Laboratorium des W. A. Obuch-Instituts für Gewerbekrankheitenforschung in Moskau.)

(Eingegangen am 19. September 1927.)

Die in unserem Laboratorium von *S. P. Rasenkow* (1), *A. N. Ptschelina* (2), *A. N. Kabanoff* (3) und *A. G. Kratinoff* (4) ausgeführten Arbeiten haben in den gefäßverengenden Eigenschaften des Blutes von Tieren vor und nach der Fütterung einen Unterschied festgestellt, der darin besteht, daß das in einem bestimmten Verhältnis mit *Ringer*scher Lösung vermischte Venenblut eines hungrigen Tieres bei Durchleitung durch die Gefäße eines isolierten Kaninchenohres meist keinen vasomotorischen Effekt oder nur eine schwache Gefäßerweiterung hervorrief, während unter denselben Bedingungen nach der Fütterung entnommenes Blut in umgekehrter Weise auf die Gefäße des Ohres wirkte, indem es eine Verengerung derselben zeigte.

Zur Aufklärung der Ursache des erwähnten Unterschiedes der gefäßverengenden Eigenschaften des Blutes vor und nach der Fütterung hat mir der Leiter des Laboratoriums, Herr Professor *J. P. Rasenkow*, vorgeschlagen, die chemische Zusammensetzung und die Eigenschaften des Blutes von Tieren vor und nach der Fütterung zu untersuchen. In diesem Teil der Arbeit wurde die aktive Reaktion des Blutes bestimmt und gleichzeitig auch der Chlorid-, Zucker- und Calciumgehalt des Blutes untersucht.

Trotz der zahlreichen Arbeiten, die der Frage nach der aktiven Reaktion des Blutes gewidmet sind, ist doch erst unlängst die Veränderung des p_H des Blutes im Zusammenhang mit dem Verdauungsprozeß festgestellt

worden. In dieser Hinsicht kann man sich auf die Arbeit *Kestners* und *Plauts* (5) berufen, die darauf hinweisen, daß sie als erste diese Frage experimentell behandeln. Die von den genannten Autoren erhaltenen Ergebnisse haben jedoch auf die von uns gestellte Frage *keine* Antwort gebracht, da uns die Veränderung der Reaktion des Blutes gerade unter den Bedingungen interessierte, unter welchen (zu Anfang der Arbeit) in unserem Laboratorium die meisten Versuche zur Untersuchung der vasomotorischen Eigenschaften des Blutes ausgeführt worden sind.

Das Versuchskaninchen erhielt 1½ bis 2½ Tage keine Nahrung; dem hungrigen Tiere wurde meist aus den Halsvenen (aus der V. jugularis) Blut entnommen; hierauf bekam es Kohl zu fressen und 3 Stunden nach Beginn der Fütterung wurde wiederum Blut entnommen (diesmal also dem satten Tiere).

Die Wasserstoffionenkonzentration wurde nach *Michaelis* (6) mit nur unbedeutenden Abweichungen elektrometrisch bestimmt. Diese Abweichungen bestanden darin, daß erstens die Spritze unmittelbar vor dem Stich mit einer gekochten und unter Luftausschluß abgekühlten physiologischen Lösung, die eine geringe Menge $Na_2C_2O_4$ enthielt, befeuchtet wurde, und daß zweitens die U-förmigen Elektroden nicht mit einer physiologischen Lösung unter nachfolgendem Zusatz eines Körnchens Hirudin oder Oxalat, wie das *Michaelis* empfiehlt, sondern mit einer physiologischen Lösung von bestimmtem $Na_2C_2O_4$-Gehalt (0,1 %) angefüllt wurden. Diese Änderungen waren nötig, um eine Gerinnung des Blutes zu verhindern.

Die beigefügte Tabelle zeigt anschaulich die erhaltenen Resultate.

Tabelle I.

Nr.	Bezeichnung des Kaninchens	p_H des Blutes eines 1½ bis 2½ Tage hungernden Kaninchens	T^0	p_H des Kaninchenblutes drei Stunden nach Beginn der Fütterung mit Kohl	T^0	$p_{H_1} - p_H$
1	A	7,41	26,5	7,48	26,0	0,07
2	B	7,36	25,5	—	—	—
3	C	7,44	23,0	7,59	24,0	0,15
4	B	7,41	23,0	7,50	23,0	0,09
5	D	7,47	24,7	7,61	25,5	0,14
6	E	7,49	25,2	—	—	—
7	F	7,41	24,0	7,47	24,5	0,06
8	G	7,58	22,0	7,73	23,2	0,15
9	G	7,53	22,5	7,53	23,5	0,00
10	H	7,52	24,2	7,66	25,0	0,14
11	H	7,57	23,0	7,63	23,0	0,06
12	H	7,63	19,0	7,70	19,0	0,07
13	I	7,59	19,0	7,69	19,0	0,10
14	K	7,51	17,7	7,68	18,0	0,17
15	H	7,62	17,0	7,74	18,0	0,12
16	L	7,50	18,0	7,71	16,5	0,21
17	N	7,49	19,0	7,64	19,0	0,15
18	O	7,47	19,0	7,57	19,0	0,10

Die Bestimmungen wurden, wie bemerkt werden muß, stets in nicht weniger als zwei Elektroden zur Kontrolle ausgeführt. In die Tabelle wurde der Mittelwert der bei der Bestimmung erhaltenen Daten eingetragen. Betrug die Differenz zwischen den Kontrollbestimmungen mehr als 2,5 Millivolt (mit anderen Worten mehr als 0,05 des p_H-Wertes), so fanden diese Daten in der Tabelle keine Aufnahme.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, wurde in einigen Fällen ein und demselben Kaninchen mehrmals Blut entnommen, und obgleich die erhaltenen Ergebnisse sich ihrem absoluten Werte nach voneinander unterscheiden, so verletzten sie jedoch die vermerkte Gesetzmäßigkeit nicht. Letztere bestand darin, daß 3 Stunden nach Beginn der Fütterung mit Kohl entnommenes Blut stets eine stärker alkalische Reaktion zeigte als Blut, das nach 1½- bis 2½tägigem Hungern entnommen wurde.

Diese Differenz der aktiven Reaktion des Blutes auf eine Temperaturveränderung, bei welcher die Untersuchungen vorgenommen wurden, zurückzuführen, ist im gegebenen Falle unmöglich, da erstens die Temperaturschwankungen sehr unbedeutend waren (Maximum 1,5°), und zweitens bei der Blutuntersuchung eines satten Tieres die Temperatur gewöhnlich höher als bei der Blutuntersuchung eines hungrigen Tieres war, was nur zu einer sauren Reaktion, nicht aber zu einer alkalischen, wie wir sie erhalten haben (7), führen konnte.

Was nun den nach der *Bang*schen Methode bestimmten Chlorid- und den nach der *Clark*schen Methode bestimmten Calciumgehalt anbetrifft, so ist es nicht gelungen, einen Unterschied im Chlorid- und Calciumgehalt des Blutes hungriger und satter Kaninchen festzustellen, wie denn überhaupt der Gehalt dieser Stoffe im Blute gesunder Kaninchen scheinbar eine ziemlich konstante Größe darstellt.

Der Zuckergehalt wurde nach der *Hagedorn*schen Methode bestimmt. Dieser Gehalt variierte bei verschiedenen Kaninchen sehr

Tabelle II.

Nr.	Zuckergehalt in % vor der Fütterung	Zuckergehalt in % nach der Fütterung	Nr.	Zuckergehalt in % vor der Fütterung	Zuckergehalt in % nach der Fütterung
1	0,132	0,170	7	0,135	0,162
2	0,178	0,185	8	0,124	0,165
3	0,122	0,185	9*	0,065	0,129
4	0,143	0,168	10	0,117	0,165
5	0,090	0,108	11	0,103	0,247
6	0,143	0,157			

* Versuch Nr. 9 wurde umgekehrt ausgeführt, d. h. es wurde zunächst das Blut eines Kaninchens 3 Stunden nach Beginn der Fütterung mit Kohl genommen (Zuckergehalt — 0,129) und darauf ließ man das Tier 2½ Tage hungern (Zuckergehalt — 0,065).



stark, jedoch war er bei satten Tieren stets größer als bei denselben Kaninchen nach einer Hungerperiode (Tabelle II). Beiläufig gesagt, ist der Zuckergehalt des Arterienblutes besonders bei satten Tieren stets größer als der des Venenblutes.

Zusammenfassung.

1. Das Blut eines Kaninchens nach einer 1½- bis 2½tägigen Hungerperiode hat eine saurere Reaktion als das demselben Tiere 3 Stunden nach Beginn der Fütterung mit Kohl entnommene Blut.

2. Der Chlorid- und Calciumgehalt des Blutes satter und hungriger Kaninchen ist derselbe.

3. Der Zuckergehalt des Blutes verschiedener Kaninchen variiert stark. Er ist bei satten Tieren größer als bei denselben Tieren nach einer 1½ bis 2½tägigen Hungerperiode.

Literatur.

1) *J. P. Rasenkow*, Gesundung der Arbeitsbedingungen und Revolution der Lebensgestaltung, Lief. VII. — 2) *A. N. Ptschelina*, ebendaselbst. — 3) *A. N. Kabanoff*, ebendaselbst. — 4) *A. G. Kratinoff*, ebendaselbst. — 5) *O. Kestner* und *R. Plaut*, Pflügers Arch. **205**, 43, 1924. — 6) *L. Michaelis*, Praktikum d. phys. Chem. insbes. d. kolloidchem. 1922. — 7) *L. Michaelis* und *W. Davidoff*, diese Zeitschr. **46**, 145, 1912.

Zur Frage
nach der chemischen Zusammensetzung und den Eigenschaften des Blutes vor und nach der Fütterung des Tieres.

II. Mitteilung:
Veränderung der Alkalireserve des Blutes und seines Gehalts an Chloriden während des Verdauungsprozesses.

Von

G. W. Derwies und **S. E. Ssewerin.**

(Aus dem physiologischen Laboratorium des W. A. Obuch-Instituts für Gewerbekrankheitenforschung in Moskau.)

(Eingegangen am 19. September 1927.)

Nachdem der eine von uns (*Ssewerin*) in seiner früheren Arbeit (s. oben, Mitteilung I) eine p_H-Änderung des Kaninchenblutes nach Fütterung des Tieres mit Kohl festgestellt hatte, haben wir uns in vorliegender Arbeit auf Vorschlag des Laboratoriumleiters Herrn Prof. *J. P. Rasenkow* die Aufgabe gestellt, die Veränderung der Alkalireserve des Blutes im Zusammenhang mit dem Verdauungsprozeß zu untersuchen.

Im Jahre 1911 haben *O. Porges, A. Leimdörfer* und *E. Markovici*[1] die Tatsache einer Zunahme der alveolaren Kohlensäurespannung nach Speiseaufnahme festgestellt. Im Jahre 1920 hat *E. C. Dodds*[2] die alveolare Kohlensäurespannung untersucht, indem er sie jede 30 Minuten nach Speiseaufnahme maß. Er fand zunächst eine Steigerung der CO_2-Spannung, darauf ein Sinken und endlich eine Rückkehr zur Norm. Derselbe Autor und *Bennett*[3] haben in den Jahren 1921/22 gefunden, daß die obenerwähnte Steigerung der alveolaren CO_2-Spannung bei Personen mit gesteigerter Salzsäureausscheidung im Magensaft größer, bei Personen aber mit herabgesetzter Salzsäureausscheidung kleiner ist. (Diese Verhältnisse haben auch *J. Hollo* und *St. Weiss*[4] im Jahre 1924 mittels ihrer neuen Methode

---

[1] *O. Porges, A. Leimdörfer* und *E. Markovici*, Zeitschr. f. klin. Med. **73**, 389, 1911.

[2] *E. C. Dodds*, Journ. of Physiol. **54**, 342 bis 348.

[3] *E. C. Dodds* und *T. Izol Bennet*, ebendaselbst **55**, 381 bis 388, 1921; *T. Izol Bennett* und *E. C. Dodds*, Brit. Medical. Journ. **1**, 9 bis 11, 1922.

[4] *J. Hollo* und *St. Weiss*, Klin. Wochenschr. 1924, S. 343.

zur Bestimmung der CO_2-Spannung bestätigt.) Genannte Autoren haben auch Versuche einer künstlichen Hemmung der Magensaftausscheidung vorgenommen, indem sie z. B. die Speise durch eine Sonde direkt in das Duodenum einführten oder die Magenschleimhaut mit Atropin befeuchteten; in diesen Fällen wurde keine Steigerung der alveolaren CO_2-Spannung beobachtet, und es begann unmittelbar ein Sinken der CO_2-Spannung. Wenn aber die Autoren die Schleimhaut des Duodenums mit Atropin befeuchteten, so stieg die alveolare CO_2-Spannung.

Demnach zeigte sich ein enges Abhängigkeitsverhältnis zwischen der Salzsäureausscheidung im Magensaft und der Alkaliausscheidung in den übrigen Verdauungssäften (angefangen vom Pylorus I) einerseits und dem Steigen mit darauffolgendem Sinken der alveolaren CO_2-Spannung andererseits. Da sich zwischen der Schleimhaut des Verdauungskanals und den Lungen Blut befindet, so ließ sich also erwarten, daß eine Ausscheidung der Verdauungssäfte irgendwelche Veränderungen im Blute hervorruft und daß letztere die Zusammensetzung der ausgeatmeten Luft beeinflussen.

Die folgenden Arbeiten von zum Teil denselben Verfassern sind Untersuchungen über die Veränderungen des Blutes gewidmet. Im Jahre 1922 haben *O. Kestner* und *O. Schlüns*[1] den Kohlensäuregehalt im Arterienblut während der Magen- und Pankreas-Darmverdauung quantitativ untersucht. Die Versuche wurden an Hunden mit Magen- und Duodenumfisteln vorgenommen. Parallel mit einer Abnahme der Atemfrequenz während der Magenverdauung haben die Verfasser bei nicht ständiger Veränderung der gesamten CO_2-Menge (öfter eine Verringerung) eine Abnahme der freien CO_2 und eine Zunahme der gebundenen beobachtet; während der Ausscheidung des Pankreassaftes stieg die Atemfrequenz, und das Verhältnis zwischen freier und gebundener CO_2 kehrte zum anfänglichen zurück. *E. C. Dodds* und *J. M. Intosch*[2] haben im Jahre 1923 den Kohlensäuregehalt des Gesamtvenenbluts von Menschen und gesondert im Plasma und in den roten Blutkörperchen während der normalen maximalen und minimalen alveolaren CO_2-Spannung, die im Zusammenhang mit Speiseaufnahme eintrat, untersucht. Sie haben gefunden, daß sich der CO_2-Gehalt des Plasmas nicht ändert; der CO_2-Gehalt der roten Blutkörperchen und dementsprechend der des Gesamtbluts steigt zunächst (maximale alveolare CO_2-Spannung), sinkt darauf unter die Norm (minimale alveolare CO_2-Spannung) und kehrt endlich zur Norm zurück.

In demselben Jahre haben *E. C. Dodds* und *K. Schirley Smith*[3] den Chloridgehalt des Gesamtvenenbluts, des Plasmas und der roten Blutkörperchen von Menschen untersucht. Bezüglich einer Veränderung der Chloride konnten die genannten Autoren drei Perioden beobachten. Die erste Periode, 40 Minuten nach Speiseaufnahme, fällt mit dem Beginn der Salzsäuresekretion mit dem Magensaft zusammen und wird durch eine Abnahme der Chloridmenge des Gesamtbluts, des Plasmas und der roten Blutkörperchen charakterisiert; die zweite Periode, 45 bis 95 Minuten nach Speiseaufnahme (individuelle Schwankungen), fällt mit der maximalen Salzsäureausscheidung zusammen und wird durch ein Steigen der Chloridmenge im Gesamtblut charakterisiert (die Menge der Chloride erreicht die Norm oder überwiegt sie um ein ge-

[1] *O. Kestner* und *O. Schlüns*, Zeitschr. f. Biol. 77, 161 bis 164, 1922.
[2] *E. C. Dodds* und *J. Mc. Intosch*, Journ. of Physiol. 57, 1923.
[3] *E. C. Dodds* und *K. Schirley Smith*, ebendaselbst 58, 157 bis 162, 1923.

ringes), wobei eine Zunahme der Chloride in den roten Blutkörperchen vor sich geht (sie enthalten jetzt mehr Chloride als bei der Norm); während der dritten Periode endlich, 90 bis 135 Minuten nach Speiseaufnahme, die mit dem Ende der Magensaftausscheidung zusammenfällt, findet ein unbedeutendes Sinken des gesamten Chloridgehalts statt und relative Mengen dieser Chloride im Plasma und in den roten Blutkörperchen kehren wiederum zur Norm zurück.

Endlich bestimmte *J. Mosonyi*[1] im Jahre 1926 den Chloridgehalt im Blutserum von Kaninchen vor und nach der Fütterung; gleichzeitig wurde auch der CO_2-Gehalt des Blutes untersucht. Der Autor fand eine Abnahme der Chloride nach 2 Stunden, die auch nach 4 Stunden die gleiche blieb, und eine Steigerung des CO_2-Gehalts, aber in weniger als äquivalenter Menge. *J. Mosonyi* ist der Ansicht, daß bei einer Magensalzsäureausscheidung eine Reaktion im Blute vor sich geht:

$$NaCl + H_2CO_3 = NaHCO_3 + HCl.$$

Wir haben uns demnach aus sämtlichen oben angeführten Arbeiten keine bestimmte Vorstellung über die Veränderung der Alkalireserve des Blutes im Zusammenhang mit einer Speiseaufnahme machen können. Die ersten Versuche wurden an Kaninchen unter denselben Bedingungen, wie die in der Arbeit von *S. E. Ssewerin* mitgeteilten, angestellt. Die isolierten Tiere ließ man 2 bis 3 Tage ohne Nahrung und Wasser, worauf man ihnen aus der präparierten V. jugularis mittels einer Spritze 4 bis 5 ccm Blut entnahm. Das Blut wurde in ein Zentrifugiergläschen entleert, an dessen Boden sich ein wenig Natriumoxalat befand, während der Abkühlung mit einem Stäbchen sorgfältig vermischt und zentrifugiert. Hierauf erhielten die Kaninchen reichlich Kohl und nach 3 bis 4 Stunden wurde aus der anderen V. jugularis wiederum Blut entnommen und das Plasma wie früher vorbereitet. Beide Plasmaproben wurden nach der gasometrischen Methode *van Slykes* auf Alkalireserve untersucht.

Wie aus der Tabelle I ersichtlich, erhielt man in zwei Fällen eine deutliche Zunahme der Alkalireserve im Plasma eines satten Tieres

Tabelle I.

Datum der Versuche	Hungrig	Satt
20. II.	39,1	48,8
22. II.	30,4	31,3
22. II.	32,3	39,8

Die Zahlen bezeichnen die in 100 ccm Plasma in Form von Bicarbonat enthaltene CO_2 in Kubikzentimetern bei 0° und 760 mm,

[1] *J. Mosonyi*, diese Zeitschr. **169**, 120. 1926.



und sind Mittelwerte von mehreren, nicht weniger als zwei, Bestimmungen

Im weiteren haben wir unsere Versuche an Hunden angestellt. Da wir die Veränderung der Alkalireserve des Blutes bei Salzsäuresekretion untersuchen wollten, so gaben wir den Hunden Fleischextrakt, dessen starke magensafttreibende Wirkung erwiesen ist. Die Versuche wurden in folgender Weise vorgenommen. Das erstemal wurde den Tieren das Blut außerhalb des Verdauungsaktes 20 bis 24 Stunden nach der letzten Fütterung entnommen; darauf wurde ein safttreibendes Mittel (10 g Fleischextrakt + 150 ccm Wasser + 50 ccm Milch, so daß der Hund eine 5 %ige Lösung des Extrakts erhielt) gegeben und darauf nach 20 bis 45 Minuten zum zweitenmal Blut entnommen. Das Blut nahmen wir aus der V. jugularis mittels einer Spritze direkt durch die Haut, wobei der Hund während der ersten Versuche an den Operationstisch gebunden, späterhin jedoch nur von einem Angestellten gehalten wurde; bei einigen Versuchen endlich wurde dem Hunde das Blut in sitzender Stellung mit Hochhaltung des Kopfes entnommen.

Tabelle II.

Datum der Versuche	Bezeichnung des Tieres	*A* Alkalireserve (nach V. S.) des Blutes vor der Fütterung	Zeit in Minuten nach der Fütterung	*A'* Alkalireserve (nach V. S.) des Blutes nach der Fütterung	*A'* — *A*
26. II. . . .	L	61,6	30	72,4	10,8
1. III. . . .	L	61,0	30	67,4	6,4
4. III. . . .	L	62,4	45	68,3	5,9
9. III. . . .	L	54,8	18	63,3	8,5
6. III. . . .	B	66,5	40	69,1	2,6
1. IV. . . .	Z	67,2	20	64,3	− 2,9
3. IV. . . .	Z	67,0	30	72,9	5,9
5. IV. . . .	Z	66,4	45	72,7	6,3
9. IV. . . .	C	71,5	95	77,7	6,2
7. IV. . . .	K	57,5	45	66,5	9,0
11. IV. . . .	K	51,8	30	59,5	7,7
14. IV. . . .	K	53,3	75	57,4	4,1
15. IV. . . .	D	48,1	20	54,8	6,7

Die Zahlen der Alkalireserve bezeichen die in 100 ccm Plasma in Form von Bicarbonat enthaltene CO_2 in Kubikzentimetern bei 0^0 und 760 mm und sind Mittelwerte von mehreren, nicht weniger als zwei Bestimmungen.

Wie aus der angeführten Tabelle II ersichtlich, ergab von 13 an 5 Hunden angestellten Versuchen nur der Versuch vom 1. April 1926 ein negatives Resultat, der Versuch vom 6. März 1926 zeigte (in den Fehlergrenzen) fast gar keine Zunahme der Alkalität. Alle anderen

Versuche ergaben eine ständige Zunahme der Alkalireserve von 9% (Versuch vom 3. April 1926) bis zu 17% (Versuch vom 26. Februar 1926).

Ferner wurden zwei Versuche mit Arterienblut nach Gabe von Fleischextrakt und zwei Versuche mit Venenblut nach Gabe von Brot und gewöhnlicher Nahrung angestellt; zu den letzterwähnten Versuchen wurde das Blut 2 bis 3 Stunden nach der Fütterung genommen. In beiden Fällen ließ sich kein Unterschied im Gehalt der Alkalireserve beobachten.

Nachdem wir eine solche Zunahme der Alkalireserve im Blute festgestellt hatten, gingen wir an die Bestimmung der Chloride im Gesamtblut. Die Arbeit *J. Mosonys* (l. c.) konnte uns keinen Anhaltspunkt geben, welche Resultate zu erwarten waren, da der Verfasser die Chloride im Blutserum bestimmt hat; bei einer Abnahme des Chloridgehalts im Plasma konnte aber ihr Gehalt in den roten Blutkörperchen steigen (besonders bei einer Zunahme der CO_2-Spannung im Blute), so daß schließlich der Gesamtchloridgehalt nicht nur ab-, sondern sogar zu-nehmen konnte. Laut den oben angeführten Ergebnissen der Arbeit *E. C. Dodds* und *Schirley Smiths* konnten wir in der ersten Zeit nach der Fütterung ein unbedeutendes Sinken des Chloridgehalts erwarten.

Da uns bekannt war, daß sich die Chloride nach der *Bang*schen Methode mit einer Genauigkeit bis zu 2 bis 3% bestimmen lassen, und da wir uns in der vorhergehenden Arbeit davon überzeugt hatten, daß eine Veränderung der Chloride bei Kaninchen nach der erwähnten Methode festzustellen nicht gelingt (vielleicht gerade darum, weil diese Methode bei solchen unbedeutenden Schwankungen, wie sie die Chloride unter genannten Bedingungen erfahren, zu wenig empfindlich ist), so haben wir uns der *van Slyke*schen Methode bedient. Die Chloride wurden in hydrolysiertem Gesamtvenenblut von Hunden bestimmt. Das erstemal wurde das Blut außerhalb des Verdauungsaktes 20 bis 24 Stunden nach der letzten Fütterung entnommen; hierauf wurde bei den einen Versuchen eine Fleischextraktlösung, bei den anderen Brot gegeben und nach 20 bis 60 Minuten zum zweiten-, manchmal auch zum drittenmal Blut entnommen. Außer den erwähnten Versuchen wurden auch Kontrollversuche angestellt, bei denen die Tiere keine Nahrung erhielten und bei denen das Blut zum zweiten- und drittenmal bei andauerndem Hungern entnommen wurde. Das Blut wurde aus der V. jugularis auf demselben Wege wie auch zur Bestimmung der Alkalireserve genommen. Bei Gabe von Fleischextrakt ließ sich nach 20 bis 30 Minuten meist eine Zunahme des Chloridgehalts um 2 bis 3% beobachten (der Extrakt selbst enthält 10 bis 15% NaCl, d. h. es wurden 1 bis 1,5 g Natriumchlorid verabfolgt); bei Brotgabe änderte sich der Chloridgehalt unregelmäßig, indem zunächst eine unbedeutende Ab-

nahme und darauf eine ebensolche Zunahme der Chloride eintrat. Bei den Kontrollversuchen blieb der Chloridgehalt ebenfalls unbeständig und zeigte in denselben Grenzen unbedeutende Schwankungen. Somit ist es uns nicht gelungen, bezüglich der Veränderung des Chloridgehalts in Abhängigkeit vom Verdauungsakt bei Hunden irgend eine Gesetzmäßigkeit festzustellen.

Zusammenfassung.

Auf Grund der von uns erhaltenen Ergebnisse kommen wir zu dem Schluß, daß während des Verdauungsaktes: 1. die Alkalireserve des Blutes zunimmt, und 2. der Chloridgehalt sich unbedeutend ändert, häufiger in der Richtung einer Zunahme.

Bestimmung des anorganischen Serumphosphors in kleinen Blutmengen.

Von

Josef Warkany.

(Aus der Reichsanstalt für Mutter- und Säuglingsfürsorge in Wien.)

(Eingegangen am 22. September 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Seit der Entdeckung der Verminderung des anorganischen Serumphosphors bei der Rachitis durch *Iversen* und *Howland* und *Kramer* ist die Bestimmung des Phosphors im Blutserum eine allgemein verwendete klinische Hilfsmethode geworden. Eine Anzahl quantitativer Methoden wurde in den letzten Jahren angegeben, von denen die kolorimetrischen von *Marriot* und *Haessler*[1] und *Bell* und *Doisy*[2] die weiteste Verbreitung gefunden haben. Man kann mit diesen Methoden bei Verwendung von 1 bis 2 ccm Blutserum eine für klinische Zwecke vollkommen genügende Genauigkeit erzielen. Wenn dies auch gegenüber älteren Methoden einen großen Fortschritt bedeutet, so dürfte es doch der Wunsch jedes Klinikers, besonders aber jedes Pädiaters sein, eine Methode zu besitzen, die mit kleineren Serummengen durchführbar ist und die eine Venen- oder Sinuspunktion überflüssig macht. Wir haben uns die Aufgabe gestellt, eine Methode auszuarbeiten, die eine Bestimmung des anorganischen Serumphosphors mit 0,1 bis 0,2 ccm Blutserum gestattet. Von *Holtz*[3] wurde eine solche Mikromethode angegeben. Doch ist zu deren Durchführung eine Ultrawage er-

---

[1] *Marriot* und *Haessler*, Journ. of biol. chem. **32**, 241, 1917.
[2] *Bell-Doisy*, ebendaselbst **44**, 55, 1920.
[3] *F. Holtz*, 36. Tagung d. deutsch. Ges. f. Kinderheilk.

forderlich, ein Umstand, der der allgemeinen Verbreitung dieser Methode hinderlich im Wege stehen dürfte[1].

Die Methode von *Bell-Doisy* in der Modifikation von *Briggs*[2], zu welcher nur ein einfaches Kolorimeter, z. B. das *Autenrieth*sche, notwendig ist, schien uns zur Umarbeitung in eine Mikromethode geeignet zu sein. Durch einige technische Modifikationen ließ sich die Methodik so weit verfeinern, daß nunmehr eine Bestimmung des anorganischen Serumphosphors mit 0,2 ccm Serum und bei größerem P-Gehalt auch mit 0,1 ccm Serum durchführbar ist.

Das Blut wird mit einem etwa 1,5 mm weiten und 10 cm langen U-Röhrchen aus der Fingerbeere, Ferse oder dem Ohrläppchen entnommen und bis zur vollkommenen Gerinnung zunächst stehen gelassen. Nach Eintritt der Gerinnung wird der Blutkuchen, der in der Höhe der freien Oberfläche des Serums meist am Glase haftet, mit einem fein ausgezogenen Glasstabe losgelöst und nun das U-Röhrchen in die Zentrifuge gebracht. Nach kurzer Zeit ist der Blutkuchen vollkommen abgesetzt, so daß man zur Gewinnung des überstehenden Serums nun die beiden Schenkel des U-Röhrchens abfeilen kann. Das Serum wird in eines der kleinen trockenen Standgefäße (s. Abb. 1), von denen eine Serie von 10 bis 20 Stück in einer Korkplatte stehend bereitgehalten wird, geblasen. Nun wird in eine fein ausgezogene 0,2 ccm Pipette die entsprechende Menge Serum aufgesogen und in ein zweites Standgefäß gebracht. Man fügt nun 0.6 ccm destillierten Wassers und 0,2 ccm 20%iger Trichloressigsäure[3] zu und läßt den Niederschlag nach kurzem Umrühren mit einem feinen Glasstäbchen 10 Minuten stehen. Das Gesamtvolumen von 1 ccm entspricht demnach 0,2 ccm Serum.

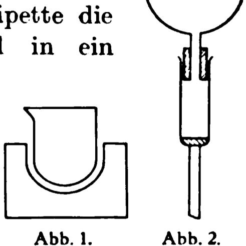


Abb. 1. Abb. 2.

Der zur Filtration zu verwendende kleine Apparat ist zuerst von *Donau*[4], in der hier angewendeten Art zur Filtration aber von *Pavelka*[5]

[1] Während des Druckes der vorliegenden Mitteilung wurde von *Brehme* und *Lepski* (Klin. Wochenschr. VI, 1927, S. 1905, Nr. 40) eine Mikromethode angegeben, die eine Modifikation der *Tisdall*schen Phosphorbestimmungsmethode darstellt. Bei dieser Methode wird aber sechsmal zentrifugiert und der gebildete Niederschlag dreimal gewaschen, wodurch die Methode sich komplizierter gestalten dürfte als die hier angegebene.

[2] *Briggs*, Journ. of biol. chem. **53**, 13, 1922; **59**, 255, 1924.

[3] Diese sowie alle übrigen Reagenzien werden genau nach den von *Bell-Doisy* bzw. *Briggs* gegebenen Vorschriften bereitet.

[4] *Donau*, Die Arbeitsmethoden der Mikrochemie aus „Handb. d. mikroskop. Technik".

[5] Mikrochemie; im Erscheinen.

angegeben worden. Er besteht (s. Abb. 2) aus einem 1½ ccm fassenden Pregl-Filter, der nach unten zu mit Asbest verschlossen wird. Auf diesem Filter wird ein mit einem Stückchen Schlauch oder einem Gummistopfen armiertes Glasrohr aufgesetzt, das sich oben zu einer Kugel erweitert. Das Glasrohr muß dem Filter luftdicht aufsitzen. Der Niederschlag wird aus dem Standgefäß in das Filterröhrchen gebracht, und diesem wird nun die Kugel aufgesetzt. Nachdem der kleine Apparat derart in eine Aufhängevorrichtung gebracht wurde, daß der Abfluß des Filters in ein darunter stehendes Standgefäß reicht, wird die Kugel mit einer leuchtenden Bunsenflamme leicht erhitzt. Durch den Druck der sich ausdehnenden Luft wird die Flüssigkeit durch den Asbest gepreßt, und das klare Filtrat gelangt in das darunter stehende Standgefäß. Mit einer fein ausgezogenen Pipette werden nun 0,5 ccm (entsprechend 0,1 ccm Serum) abpipettiert und in ein 1-ccm-Meßkölbchen gebracht. Gleichzeitig werden 2 bis 4 bis 6 ccm der Phosphatstandardlösung (entsprechend 0,025 bis 0,05 bis 0,075 mg P) in ein 10-ccm-Meßkölbchen gebracht. In das 1-ccm-Meßkölbchen wird nun von jeder der folgenden Lösungen je 0,1 ccm hinzugefügt, in das 10-ccm-Kölbchen je 1 ccm. Die drei nun nach der Reihe zugefügten Reagenzien werden nach *Briggs* in folgender Weise bereitet:

1. Ammon-Molybdat-Reagens: 25 g Ammonium-Molybdat in 300 H_2O + 75 ccm konz. H_2SO_4 in 125 H_2O.

2. Hydrochinon-Reagens: 0,5 g Hydrochinon auf 100 H_2O + 1 Tropfen konzentrierter H_2SO_4.

3. 20 %ige wässerige Natrium-Sulfitlösung.

Nach Zufügen dieser Lösungen beträgt der Inhalt des 1-ccm-Kölbchens 0,8 ccm, der des 10-ccm-Kölbchens 5 bis 7 bis 9 ccm. Nun werden beide sorgfältig bis zur Marke aufgefüllt und dann ½ Stunde stehen gelassen. Darauf wird der Inhalt des 10-ccm-Kölbchens in den Keil, der des 1-ccm-Kölbchens in den Trog des *Autenrieth*-Kolorimeters gebracht. Der Milligrammprozentgehalt des Serums ist bei gleicher Schichtdicke und Farbengleichheit direkt dem Milligrammprozentgehalt der Standardlösung gleichzusetzen. Die Berechnung ist genau dieselbe wie bei der Originalmethode von *Bell* und *Doisy*, die zwar mit der 10fachen Serummenge arbeitet, aber auch auf das 10fache Volumen auffüllt, so daß die Konzentration der kolorimetrierten Lösung dieselbe ist, wie bei unserer Mikromethode.

Es ist einleuchtend, daß die hier angegebene Mikromethode dieselben Werte geben muß, wie die Originalmethode, sofern die Möglichkeit besteht, mit den kleinen Mengen genügend exakt zu arbeiten. Daß dies tatsächlich der Fall ist, geht aus den folgenden Vergleichsanalysen hervor.

	Originalmethode *Bell-Doisy-Briggs* mit 2 ccm Serum mg.⁰/₀	Mikromethode mit 0,2 ccm Serum mg.⁰/₀
Tetanie-Rachitis (7 Mon. altes Kind) . . .	3,0	3,0
Di-Heilserum	3,6	3,6
„ mit P-Zusatz	4,2	4,6
Kaninchenserum	7,5	7,4
„	6,6	6,9
Rinderserum	7,5	7,1
Verdünntes Rinderserum	6,4	6,1
„ „	3,5	3,4
„ „	3,1	3,1
„ „	2,4	2,4

Es wurde ferner der Versuch gemacht, die Methode an Zusatzversuchen zu erproben. Zu verdünntem Serum, dessen P-Gehalt zunächst ermittelt wurde, wurden verschiedene Mengen von Phosphatlösungen zugesetzt. Der errechnete „Sollwert“ ist in der folgenden Tabelle mit dem tatsächlich gefundenen Werte in Vergleich gesetzt.

Sollwert mg.⁰/₀	Gefundener Wert mg.⁰/₀	Sollwert mg.⁰/₀	Gefundener Wert mg.⁰/₀
1,8	1,8	4,8	5,1
6,0	6,1	1,5	1,5
1,4	1,5	7,2	7,2
1,5	1,5		

Zum Schluß seien noch einige Phosphorwerte angeführt, die bei normalen oder rachitischen Kindern mit der Mikromethode (0,2 ccm Serum) gefunden wurden:

Normales Kind, 1½ jährig . . . . 4,5 mg-⁰/₀
„ „ 2 „ . . . . 5,1 „
„ „ 10 „ . . . . 4,5 „
„ „ 2 Monate . . . . 4,6 „
„ „ 4 jährig . . . . 5,4 „
„ „ 1½ „ . . . . 5,0 „
Frühgeburt (weicher Schädel, 1 Monat) . . . . . . 3,6 „
Rachitisches Kind, 3½ Monate . . . . 3,2 „
„ „ 2½ „ . . . . 3,4 „
„ „ 11 „ . . . . 2,9 „
„ „ 14 „ . . . . 1,9 „
„ „ 12 „ . . . . 3,0 „
„ „ 16 „ . . . . 2,8 „
Geheilte Rachitis . . . . 6,0 „

Es zeigt sich demnach, daß die Mikromethode in der hier angegebenen Form sowohl gut mit der Makromethode übereinstimmt, als auch bei Zusatzversuchen und bei klinischer Verwendung gute Resultate liefert.

Zur Kenntnis des Bergenins. I.

Von

W. S. Ssadikow und R. Guthner.

(Aus dem Staats-Institut für angewandte Chemie zu Leningrad.)

(Eingegangen am 23. September 1927.)

I.

Die in größerem Umfange angestellten Versuche, aus der sibirischen Pflanze Saxifraga crassifolia (auch Bergenia crassifolia oder Badan genannt) einen veredelten Gerbextrakt zu gewinnen, hatten ergeben, daß hier ein neues, leicht zugängliches Gerbmittel vorliegt, das den südamerikanischen Quebracho-Extrakt mit Erfolg ersetzen kann[1].

Die Verarbeitung beträchtlicher Mengen von Badanwurzeln veranlaßte uns, auch einige Nebenprodukte zu untersuchen. Unter diesen rief besonders eine glucosidartige Substanz, das Bergenin, unser Interesse wach, da sich dieser Stoff gut in kristallinischer Form abscheiden und in recht hoher Ausbeute gewinnen läßt.

Das Bergenin wurde zum ersten Male von *Garreau* im Jahre 1850 erhalten. Später nahm *E. Morelle*[2] eine nähere Untersuchung vor, auf Grund deren er annimmt, das Bergenin von *Garreau* besitze den Charakter eines Zuckeralkohols und einen dem Mannit, Pinit oder Quercit ähnlichen Bau; daher müsse diese Verbindung nicht als Bergenin, sondern als *Bergenit* bezeichnet werden.

Morelle gewann seine Substanz durch Auslaugen von frischem Badanrhizom mit heißem Wasser (80° C). Die Auszüge wurden von Tanniden durch Ausfällen derselben mit neutraler Bleiacetatlösung gereinigt; das von Gerbstoffen befreite Filtrat wurde zur Entfernung des überschüssigen Bleies mit Schwefelwasserstoff behandelt. Nach dem Einengen der Lösung schieden sich alsbald die Bergenitkristalle

---

[1] Arbeiten des Staats-Instituts für angewandte Chemie Nr. 6; *W. S. Ssadikow* und *P. A. Yakimow*, Über die Gewinnung von hochwertigen Extrakten aus Badan und anderen inländischen Gerbmaterialien (russisch), 1927.

[2] C. r. 93, 646, 1881.

ab, die vollkommen farblos waren und einen bitteren Geschmack besaßen.

Die Kristalle gehören dem orthorhombischen System an. Der Prismenwinkel ist gleich 91° 15'; der Winkel der Seitenflächen des Prismas ist gleich 126° 22'. Der Bergenit dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach links: $[\alpha]_D = -51° 36'$. Die Substanz ist in Wasser und kaltem Alkohol nur wenig löslich; leichter löst sie sich in heißem Alkohol.

Morelle hat ein eigentümliches Verhalten des Bergenits beim Schmelzen wahrgenommen: Bei 130° beobachtet man nämlich ein wahres Schmelzen, bei weiterer Erhöhung der Temperatur findet aber Wasserverlust statt und die Substanz geht wieder in den festen Zustand über, der bestehen bleibt, bis die Temperatur von 230° erreicht ist, worauf abermals Verflüssigung eintritt.

Der Bergenit besitzt, nach den Analysen von *Morelle*, die Zusammensetzung $C_8H_{12}O_6$ oder vielleicht $C_8H_{10}O_5 . H_2O$, denn beim Erwärmen auf 180° wird ein Molekül Wasser abgespalten.

Morelle vermochte den Bergenit auch bei andauerndem Kochen mit Mineralsäuren nicht zu spalten. Nach Erwärmen im Einschlußrohr mittels Essigsäure während 48 Stunden gelangt man zu einem amorphen, in Wasser leicht löslichen Produkt, das auch in Alkohol und Äther gut löslich ist und folgende Zusammensetzung aufweist: $C_{10}H_{12}O_6$. Es liegt ein *Mono-acetyl-derivat des Bergenits* vor, entstanden aus der Verbindung $C_8H_{10}O_5$, die ihrerseits durch Wasserverlust aus der ursprünglichen Verbindung: $C_8H_{10}O_5 . H_2O$ oder $C_8H_{12}O_6$ hervorgegangen ist. Unter Einwirkung von Acetylchlorid bei 100° gelangt man zu einer kristallinischen Substanz, die sich nur in heißem Alkohol gut löst und sich beim Erkalten in Form rhombischer Plättchen und Nadeln abscheidet. Sie besitzt die Zusammensetzung $C_{14}H_{13}O_8$ oder $C_8H_4O_2(C_2H_3O_2)_3$. Wir haben demnach ein *Triacetylderivat des Bergenits* vor uns.

Mit Hilfe von Benzoylchlorid wurde von *Morelle* auch ein Tribenzoylderivat dargestellt. Bei nachträglichem Acetylieren der Triacetylverbindung gewann *Morelle* schließlich auch ein Penta-acetyl-derivat des Bergenits von der Formel $C_{18}H_{20}O_{10}$ bzw. $C_8H_5(C_2H_3O_2)_5$.

Die älteren Untersuchungen von *E. Morelle* lassen sich, wenn man seine Angaben in der heute üblichen Formulierung wiedergibt, folgendermaßen zusammenfassen:

1. Die Penta-acetyl-verbindung des Bergenits ist als Derivat eines mehratomigen Alkohols, $C_8H_5(OH)_5$, zu betrachten.

2. Das Mono-acetyl-derivat entsteht aus der Verbindung $C_8H_{10}O_5$ oder $C_8H_9O_4(OH)$.

3. Die Verbindung $C_8H_{10}O_5$ geht aus dem ursprünglichen Bergenit hervor, dem die Formel $C_8H_{12}O_6$ zukommt.

4. Sowohl beim Erwärmen des ursprünglichen Bergenits, als auch beim Acetylieren desselben entstehen Acetylderivate von der Zusammensetzung $C_8H_{10}O_5$, aber nicht von der Formel $C_8H_{12}O_6$. Bei der Acetylierung findet somit Abspaltung eines überschüssigen Wassermoleküls statt außer denjenigen, die aus den Essigsäuremolekülen entstehen.

5. Als ursprünglichste Formel des Bergenits dürfte man wohl $C_8H_{12}O_6$ bzw. $C_8H_6(OH)_6$ oder wahrscheinlich $C_6(OH)_6(CH_3)_2$ bzw. $C_6H(OH)_5(CH_3)(CH_2OH)$ anzunehmen haben. Die oben entwickelten Anschauungen lassen sich auch durch folgende Strukturformeln wiedergeben:

I. Ursprünglicher Bergenit: $C_8H_{12}O_6$

$C.OCH_3$
$OHHC$ COH
$OHHC$ $C.OH$
$C.CH_2OH$

Dihydro-tetroxy-methoxy-phenyl-methanol.

II. Erhitzter Bergenit: $C_8H_{10}O_5$

$C.OCH_3$
HC COH
O
HC COH
$C.CH_2OH$

Anhydro-dihydro-tetroxy-methoxy-phenyl-methanol.

III. Monoacetyl-derivat des Bergenits: $C_8H_9(CO_2CH_3)O_4$

$C.OCH_3$
HC COH
O
HC COH
$C.CH_2.CO_2CH_3$

IV. Triacetyl-bergenit: $C_8H_7(C_2H_3O_2)_3O_2$

$C.OCH_3$
HC $C.CO_2CH_3$
O
HC $C.CO_2CH_3$
$C.CH_2.CO_2CH_3$

V. Pentaacetyl-bergenit: $C_8H_7(C_2H_3O_2)_5O$

$C.OCH_3$
$CH_3CO_2.HC$ $C.CO_2CH_3$
$CH_3CO_2.HC$ $C.CO_2CH_3$
$C.CH_2.CO_2CH_3$

Die eben angeführte Formulierung der Struktur des Bergenits kann durch folgende Erklärung erhärtet werden:

a) Beim Erhitzen des Bergenits wird ein Molekül Wasser abgespalten; die benachbarten zwei sekundär-alkoholischen OH-Gruppen werden unter Wasserabgabe in eine Oxydbindung umgewandelt. Das abspaltbare Wasser ist bestimmt kein molekular gebundenes Kristallwasser.

b) Die Bildung eines Penta-acetyl-derivats des Bergenits kann nur dadurch eine Erklärung finden, daß bei der erschöpfenden Acetylierung die zuerst entstandene Oxydform hydratisiert und in die sekundäre Alkoholform verwandelt wird.

c) Bei der partiellen Acetylierung des Bergenits (Mono- und Triacetylderivate) wird eine Oxydbildung beobachtet, ähnlich wie sie beim Erwärmen des Bergenits stattfindet.

d) Es ist wahrscheinlich, daß der Bergenit aus einem sechsgliedrigen Kohlenstoffring besteht, und daß sich die restlichen beiden Kohlenstoffatome in der Seitenkette befinden, nämlich in Form von zwei Methylgruppen. Die Tatsache, daß die höchste erreichbare Acetylierungsstufe des Bergenits nur die Penta-acetyl-verbindung ist, spricht dafür, daß die Sechsstellung im Kohlenstoffring durch eine *Methoxylgruppe* besetzt ist. Da aber die fünfte Stelle, an der eine Seitenkette substituiert ist, doch acetylierbar ist, kann man mit großer Wahrscheinlichkeit die Gegenwart eines *Methanolrestes* annehmen.

e) Der Sechskohlenstoffring des Bergenits ist ein teilweise hydrierter Benzolring, nämlich ein Dihydrobenzolderivat. Als Beweis für eine derartige Auffassung kann außer der empirischen Zusammensetzung der Substanz auch die außerordentliche Widerstandsfähigkeit des Bergenits gegenüber spaltenden Agenzien dienen, sowie gleichfalls seine Unfähigkeit, Furfurol und Benzoesäure zu bilden.

II.

Die Darstellung eines veredelten Gerbextrakts aus Badanwurzeln erfolgt derart, daß das in entsprechender Weise vorgetrocknete und gemahlene Material mit sehr kaltem Wasser (0 bis 5°) ausgelaugt wird. Der mit Nichttanniden angereicherte *kalte Auszug* wird beiseite gestellt; das mit kaltem Wasser erschöpfte Gerbmaterial wird nunmehr mit heißem Wasser (80 bis 90°) nachbehandelt und der auf diese Weise erhaltene *heiße Auszug* bis zur Trockne in vacuo eingeengt. Der Rückstand enthält bis zu 65% an Tanniden und ungefähr 20% an Nichtgerbstoffen.

Der erste kalte Auszug enthält bedeutende Mengen von zuckerartigen Stoffen und von Bergenin: Nach dem Einengen im Vakuum bis zur Sirupkonsistenz kann das Bergenin gewonnen werden. Die

echten Zuckerstoffe können wegen ihrer Leichtlöslichkeit in Wasser bequem abgetrennt werden. Da aber in den kalten Auszügen aus Badanwurzeln bisweilen pektin- und harzartige Substanzen zugegen sind, welche die Löslichkeit des Bergenins bei Gegenwart von zuckerartigen Stoffen erheblich vermehren, so müssen dieselben zweckmäßig entfernt werden, um eine erfolgreiche Isolierung des Bergenins zu bewirken. Nach wiederholter Behandlung des kalten Auszugs mit Äther und nach dem Verdünnen mit viel Wasser scheidet sich ein beträchtlicher kristallinischer Niederschlag von Bergenin ab. Derselbe wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Das Filtrat wird eingeengt, wiederum mit Äther ausgeschüttelt und mit Wasser verdünnt.

Aus 5000 g des kalten Auszugs gewinnt man z. B. etwa 300 g Roh-Bergenin. Die Menge desselben ist aber viel größer auf die gesamte Badanwurzel bezogen. Behandelt man die tannidhaltigen Rückstände des kalten Auszugs oder auch den heißen Auszug mit neutralem Bleiacetat, so erhält man im Filtrat der ausgefällten Bleitannidverbindungen noch große Mengen von Bergenin. Wir haben aber zunächst in der Hauptsache die ersten sich unmittelbar abscheidenden Fällungen aus den kalten Auszügen untersucht.

Das Roh-Bergenin wurde nunmehr einer fraktionierten Kristallisation aus alkoholischer Lösung unterworfen. Man erhält farblose, glänzende Kristalle. Beim Umkristallisieren aus Wasser sind die Kristalle immer schwach gelblich gefärbt.

Die gut ausgebildeten Kristalle des Bergenins sind nach dem kristallochemischen Verfahren im *Fedorow*schen Institut zu Leningrad von *N. N. Padurow* untersucht worden.

Art der Symmetrie	Rhombo-sphäroedrisch
Kombination des Prismas	(110)
Kombination des Rhombosphäroeders	(111)
Winkel des Prismas	88° 45′
Symbol des Komplexes	40 37½ 37′

Nach den *Fedorow*schen Tabellen[1] ähnelt das Bergenin am meisten der folgenden Verbindung:

$$\text{l-Tetraacetyl-}\beta\text{-methylglucosid, } C_6H_7O(OC_2H_3O)_4(OCH_3),$$

F = 104 bis 105°, welche das Symbol des Komplexes besitzt: 40 38° 7′.

[1] *Fedorow*, Das Kristallreich, Tabellen zur kristallochemischen Analyse. Petrograd 1920.



Bei weiterer Fraktionierung von 50 g des vorgereinigten Bergenins wurden folgende Fraktionen erhalten:

1. Fraktion:	18 g;	Doppelter Schmelzpunkt:	137 und 228°
2. „	18 g;	„ „	137—138 und 229°
3. „	3 g;	„ „	137—138 „ 229°
4. „	5 g;	„ „	138—139 „ 230°
5. „	8 g;	„ „	138—139 „ 230°

Wir haben hier das Phänomen des doppelten Schmelzpunktes, das schon von *Morelle* beobachtet worden war. Unsere Präparate haben einen etwas höheren anfänglichen Schmelzpunkt als diejenigen von *Morelle*, nämlich 138 anstatt 130°, während der zweite endgültige Schmelzpunkt übereinstimmt (230°). Unsere Ausgangssubstanz scheint etwas anders gebaut zu sein als diejenige bei *Morelle*, dagegen sind die durch Temperatureinwirkung entstehenden Substanzen in beiden Fällen identisch.

Ein Unterschied zwischen dem *Morelle*schen Bergenit und unseren Präparaten ergibt sich auch in bezug auf die kristallographischen Größen; z. B. beträgt der Prismenwinkel beim Bergenit 91° 15′, bei dem von uns dargestellten Bergenin 88° 45′. Unsere Bergeninpräparate sind etwas löslich in heißem Wasser, etwas mehr löslich in Alkohol, Pyridin, Eisessig. Die Lösungen von 0,6 bzw. 1,0 g Bergenin in 100 ccm Wasser oder Alkohol scheiden nach längerem Stehen bei Zimmertemperatur einen dicken Bodensatz ab, der aus Bergeninkristallen besteht. Derartige Abscheidungen finden statt beim Hinzufügen einiger Reagenzien zu wässerigen Lösungen des Bergenins, wie z. B. von Eisenchloridlösung.

Das Bergenin zeigte folgende Reaktionen:

1. Mit Eisenchloridlösung entsteht eine violette Färbung, was auf die Anwesenheit von Phenolhydroxylen hinweist.
2. Schwache Natronlauge ruft eine braune Färbung der Bergeninlösung hervor.
3. Ammoniakalische Silberoxydlösung wird reduziert.
4. *Fehling*sche Lösung wird beim Erwärmen mit Bergeninlösung ebenfalls zu Kupferoxydul reduziert.
5. Basisches Bleiacetat gibt einen Niederschlag, der im Überschuß des Reagens löslich ist.
6. Saure Permanganatlösung wird entfärbt.
7. Phloroglucin, Orcin, Benzidin und α-Naphthol verhalten sich negativ.
8. Phenylhydrazin bildet keine Hydrazone bzw. Osazone.
9. Semicarbazid verhält sich negativ.
10. Bei Oxydation mit Salpetersäure werden keine Saccharidsäuren und auch keine Benzoesäure gebildet.

Analysen des Bergenins.

I. Fraktion 1:

0,1590 g; 0,2833 g CO_2; 0,0825 g H_2O; C = 48,56%; H = 5,80%
0,1047 g; 0,1869 g CO_2; 0,0538 g H_2O; C = 48,67%; H = 5,75%

II. Fraktion 2:

0,1657 g; 0,2954 g CO_2; 0,0810 g H_2O; C = 48,62%; H = 5,47%

III. Fraktion 5:

0,1034 g; 0,1850 g CO_2; 0,0486 g H_2O; C = 48,80%; H = 5,26%

IV. Fraktion 1, aus Wasser umkristallisiert:

0,1720 g; 0,3059 g CO_2; 0,0862 g H_2O; C = 48,52%; H = 5,60%

V. Bergenin, aus Alkohol mehrfach umkristallisiert:

0,1944 g; 0,3459 g CO_2; 0,0965 g H_2O; C = 48,50%; H = 5,55%

Bestimmung des Molekulargewichts.

Das Molekulargewicht des Bergenins wurde ebullioskopisch ermittelt unter Anwendung von absolutem Alkohol als Lösungsmittel.

1. 0,5320 g Bergenin in 11,9080 g Alkohol gelöst:

Siedepunkt der Lösung . . . . 1,79°
,, des Lösungsmittels . . . . . . 1,64°
Siedepunktserhöhung . . . . 0,15°

$$\text{Mittel} = \frac{11{,}7 \cdot 0{,}5320 \cdot 100}{0{,}15 \cdot 11{,}9080} = 348.$$

2. 0,6350 g Bergenin in 14,6120 g Alkohol gelöst:

Siedepunkt der Lösung . . . . 1,88°
,, des Lösungsmittels . . . . . 1,73°
Siedepunktserhöhung . . . . 0,15°

$$\text{Mittel} = \frac{11{,}7 \cdot 0{,}6350 \cdot 100}{0{,}15 \cdot 14{,}612} = 339.$$

Zusammenstellung der Analysen.

(Durchschnittswerte.)

	Gefunden %	Berechnet auf $(C_7H_{10}O_5)_2$ %
C	48,61	48,28
H	5,57	5,74
Molekulargewicht	348, 339	348

Das *Bergenin*, das wir aus Badanextrakten isoliert haben, besitzt also die empirische Zusammensetzung: $C_{14}H_{20}O_{10}$, während der von *Morelle* gewonnene Bergenit die Zusammensetzung: $C_8H_{12}O_8$ zeigte.

Die Analyse des Bergenins nach Behandlung desselben bei 110° ergab folgendes:

1. 2,8435 g Substanz gaben 0,1960 g Wasser ab, d. h. 6,80 %
   2,1124 g „ „ 0,1418 g „ „ „ „ 6,70 %
2. 0,1850 g; 0,3461 g CO_2; 0,0920 g H_2O; C = 51,02 %; H = 5,57 %

	Gefunden %	Berechnet auf $C_{14}H_{18}O_9$ %
Gewichtsverlust	6,75	5,18
C	51,02	50,09
H	5,57	5,49

Das Trocknen des lufttrocknen Bergenins bei 110° bewirkt den Verlust eines Moleküls Wasser.

Acetylierung des Bergenins.

Lufttrockenes Bergenin wurde mit Essigsäureanhydrid und Natriumacetat gekocht; man gewinnt ein kristallinisches Acetylierungsprodukt, das in Alkohol leicht löslich ist und bei 192,5 bis 193,5° schmilzt.

Einzelne Darstellungen der erwähnten Acetylderivats ergaben folgende Gehalte an Kohlenstoff und Wasserstoff:

Präparat I:
0,1540 g; 0,2992 g CO_2; 0,0703 g H_2O; C = 52,98 %; H = 5,10 %

Präparat II:
0,1181 g; 0,2312 g CO_2; 0,0544 g H_2O; C = 53,30 %; H = 5,15 %

Präparat III:
0,2050 g; 0,4028 g CO_2; 0,0902 g H_2O; C = 53,60 %; H = 4,92 %

Bestimmung des Molekulargewichts.

Das Molekulargewicht des Acetylderivats wurde ebullioskopisch ermittelt unter Anwendung von absolutem Alkohol als Lösungsmittel.

1. 0,5460 g Acetylderivat in 11,880 g Alkohol gelöst:

Siedepunkt der Lösung . . . . 1,71°
„ des Lösungsmittels . . . . . 1,63°
Siedepunktserhöhung . . . . 0,08°

$$\text{Mittel} = \frac{11,7 \,.\, 0,546 \,.\, 100}{11,88 \,.\, 0,08} = 672.$$

2. 0,6302 g Acetylderivat in 13,470 g Aklohol gelöst:

Siedepunkt der Lösung . . . . 1,82°
„ des Lösungsmittels . . . . . 1,73°
Siedepunktserhöhung . . . . 0,09°

$$\text{Mittel} = \frac{11,7 \,.\, 0,6302 \,.\, 100}{13,47 \,.\, 0,09} = 608.$$

Zusammenstellung der Ergebnisse.

	Gefunden			Berechnet für $C_{34}H_{40}O_{20}$
	I %	II %	III %	
C	52,98	53,30	53,60	53,12
H	5,10	5,15	4,92	5,20
Molekulargewicht . . .	672	608	—	768

Die Formel des Acetylderivats kann folgendermaßen erklärt werden: $C_{14}H_{10}(O \cdot COCH_3)_{10}$.

Wir haben somit ein Deka-acetyl-bergenin vor uns; das Bergenin selber kann durch die Formel $C_{14}H_{10}(OH)_{10}$ ausgedrückt werden. Sie enthält zehn alkoholische bzw. sekundäralkoholische oder phenolische, acetylierbare Hydroxylgruppen.

Verwendet man zur Acetylierung das im Exsikkator bis zur Gewichtskonstanz vorgetrocknete Bergenin, so ergibt die Analyse des Acetylierungsprodukts folgende Werte:

0,1685 g; 0,3233 g CO_2; 0,0767 g H_2O; C = 53,18%; H = 5,20%
0,1964 g; 0,3828 g CO_2; 0,0866 g H_2O; C = 53,16%; H = 4,93%

Beim Acetylieren des Bergenins, das bei 130° vorgetrocknet war, erhielten wir folgende Werte:

0,1314 g; 0,2576 g CO_2; 0,0590 g H_2O; C = 53,46%; H = 5,02%
0,1880 g; 0,3690 g CO_2; 0,0806 g H_2O; C = 53,47%; H = 4,80%

Man erhält die gleichen Acetylierungsprodukte, einerlei, ob man das Bergenin in der Luft, im Exsikkator oder unter Erwärmen auf 130° vorgetrocknet hat. Da im letzten Falle eine Abspaltung von einem Molekül Wasser stattfindet, das nur auf Kosten von zwei acetylierbaren Hydroxylen gebracht werden könnte, so ist die Bildung einer Deka-acetyl-verbindung allein so zu erklären, daß während der Acetylierung das Wiederauftreten der verschwundenen Hydroxyle angenommen wird. Dies könnte tatsächlich der Fall sein, wenn der durch Erwärmen gebildete *Oxydring* wieder hydrolytisch gespalten wird.

Hydrolytische Spaltung des Bergenins.

Um die chemische Natur des Bergenins näher aufzuklären, sollte entschieden werden, in welcher Weise die zahlreichen Hydroxylgruppen im Bergeninmolekül miteinander verknüpft sind und ob sie nicht zu zuckerartigen Komplexen gehören. Durch Anwendung andauernder Hydrolyse wäre diese Frage zu lösen.

Versuch 1. 10 g Bergenin wurden 60 Stunden lang mit 5%iger Schwefelsäure gekocht. Nach dem Erkalten der Lösung schied sich ein kristallinischer Niederschlag (etwa 5 g) ab, der den für das ursprüngliche Bergenin charakteristischen doppelten Schmelzpunkt 130 und 230°

aufwies. Mit Eisenchloridlösung trat violette Färbung auf, durch basisches Bleiacetat erfolgte Fällung, die sich im Überschuß des Fällungsreagens wieder löste. Die Analyse ergab Werte, die mit dem ursprünglichen Bergenin gut übereinstimmen.

0,1562 g; 0,2790 g CO_2; 0,0786 g H_2O; C = 48,70 %; H = 5,63 %.

Das Filtrat des oben erwähnten Niederschlags wurde nach Entfernung der Schwefelsäure durch Barytwasser eingeengt, wobei sich noch eine erhebliche Menge von unverändertem Bergenin abschied. Irgendwelche zuckerartige Spaltungsprodukte sind nicht vorhanden.

Versuch 2. 3 g Bergenin wurden 48 Stunden mit 5 %iger Salzsäure auf dem Wasserbad erwärmt. Nach dem Erkalten fiel unverändertes Bergenin aus. Beim Einengen des Filtrats schieden sich noch weitere Mengen von Bergenin mit dem doppelten Schmelzpunkt 130 und 230° ab. Phenylhydrazin verhält sich negativ; ebenfalls versagten die Reaktionen auf Furfurol und auf Zucker.

Auf Grund dieser Beobachtungen kann man schließen, daß das Bergenin keine zuckerartige oder glucosidartige Struktur besitzt, sondern wahrscheinlich wie ein zyklisches Polyphenol gebaut ist. Die überaus schwere Angreifbarkeit des Bergenins bei der Hydrolyse läßt kaum die Annahme zu, daß im Bergeninmolekül Methoxylgruppen vorkommen.

Behandelt man 0,7960 g Bergenin mit 25 ccm HJ nach *Zeisel-Fanto*, so erhält man 0,5794 g AgJ bzw. 0,3131 g J an die abgespaltenen CH_3-Gruppen gebunden oder 9,30 % Methylgruppen in der Substanz. Die Berechnung auf zwei Methylgruppen im Bergeninmolekül ergibt 8,62 %.

Da das Vorhandensein der Methoxylgruppen aus verschiedenen Gründen ausgeschlossen zu sein scheint (Resistenz des Bergenins bei der Hydrolyse, Bildung einer Deka-acetyl-verbindung usw.), so bleibt nur übrig, die Anwesenheit von zwei acetylierbaren und als CH_3J abspaltbaren *Methanolgruppen* anzunehmen.

Das Bergenin besitzt ein bedeutendes Drehungsvermögen. Dasselbe läßt sich nur schwer genau ermitteln, weil das Bergenin nur sehr wenig in Alkohol löslich ist und, wie schon oben erwähnt, sich sogar aus ziemlich verdünnten Lösungen abscheidet. Deswegen sind die Ablesungen des Drehungswinkels nicht gut auszuführen und mit einem größeren Umrechnungsfehler verbunden.

1. 0,3216 g Bergenin in 50 ccm absolutem Alkohol gelöst. C = 0,6432:
   bei l = 22 : α = 0,67°; $[\alpha]_D$ = + 47,2°,
   „ l = 10 : α = 0,33°; $[\alpha]_D$ = + 51,3°.
2. 0,2240 g Bergenin in 50 ccm absolutem Alkohol gelöst. C = 0,448:
   bei l = 22 : α = 0,44°; $[\alpha]_D$ = + 44,6°,
   „ l = 10 : α = 0,18°; $[\alpha]_D$ = + 40,0°.

Bei unseren Bergeninpräparaten haben wir eine Rechtsdrehung beobachtet, während *Morelle* für seinen Bergenit eine Linksdrehung angibt: $[\alpha]_D = -51{,}36^0$. Das Deka-acetyl-bergenin dreht ebenfalls nach rechts und besitzt ein kleineres Drehungsvermögen.

0,3620 g Decaacetylbergenin in 50 ccm absolutem Alkohol gelöst. C = 0,724:

bei $l = 22 : \alpha = 0{,}40^0$; $[\alpha]_D = +25{,}2^0$,
„ $l = 10 : \alpha = 0{,}19^0$; $[\alpha]_D = +26{,}2^0$.

Das Vorhandensein von asymmetrischen Kohlenstoffatomen in Bergeninmolekül erleichtert die nähere Erkenntnis seiner Struktur. Die Verbindung besteht sicher aus zwei sechsgliedrigen Ringen, die mit zwei Methanolresten versehen sind. Die sechsgliedrigen, mit Hydroxylen substitutierten Ringe können aber keine einfachen Benzolringe oder Polyphenolringe sein, da in einem solchen Falle jedes Kohlenstoffatom mit Doppelbindung im Ring gebunden ist und nicht asymmetrisch sein könnte. Die Entstehung einer Asymmetrie kann durch partielle Hydrierung des Ringes bedingt werden. Es liegt somit im Bergenin eine Verkettung von zwei teilweise hydrierten Benzolringen vor.

Auf Grund aller Tatsachen und Erläuterungen, die wir im Laufe unserer Untersuchung gesammelt haben, könnte man die Struktur des Bergenins in folgender Weise darstellen: $C_{14}H_{20}O_{10}$

```
           COH                             *
      OHC/ \\COH                        HC.CH2OH
        ||   |                      * /    \
        || I.|*               OHHC         C.OH
      OHC    CH————————————HC*  II.  ||
        \   /                    \       C.OH
        HCOH                       HC.CH2OH
         *                            *
```

Bei der Spaltung könnte einerseits folgende Verbindung entstehen:

```
        COH
   OHC/ \\COH
     ||  I. |
   OHC\    /CHOH
        HCOH
```

$C_6H_8O_6$, Dihydrohexaoxybenzol, das vielleicht im Pflanzenstoffwechsel eine intermediäre Stufe bei der Entstehung des Inosits bildet ($C_6H_{12}O_6$).

Andererseits könnte sich folgende Verbindung bilden: $C_8H_{14}O_6$ oder $C_8H_{12}O_6$

```
      HC.CH2OH                      HC.CH2OH
 OHHC/    \COH                 OHC/    \COH
     | II. ||        und         || II. ||
 OHHC\    /COH                 OHC\    /COH
      HC.CH2OH                      HC.CH2OH
```

Letztere Verbindung ist mit dem *Bergenit* von *Morelle* isomer. $C_8H_{12}O_6$.

```
        HC.OCH3
   OHC/    \C.OH
      ||II. ||
   OHC\    /C.OH
        HC.CH2OH
```

Es muß noch durch weitere Untersuchungen entschieden werden, ob der Bergenit durch chemische Angriffe aus dem Bergenin darstellbar ist, oder ob wir es hier mit biochemischen Vorgängen zu tun haben, die nur unter besonderen Lebensbedingungen in der Pflanze auftreten.

In theoretischer Hinsicht hat das Bergenin ein außerordentliches Interesse, da diese Substanz sicher die engsten Beziehungen aufweist, sowohl zu den hydroaromatischen Verbindungen und den Zuckerstoffen als auch zu den Gerbstoffen, die vielleicht durch Oxydation von Methanolgruppen zu Carboxylgruppen aus dem Bergenin leicht entstehen können (Bergenincarbonsäuren). Ob das Bergenin als Muttersubstanz von Badantanniden betrachtet werden kann, sollen die Untersuchungen über die Konstitution von Badangerbstoffen aufklären.

Fortgesetzte Untersuchung zur Frage der Entstehung von Zucker aus Fett.

Von

Yuzuru Kojima.

[Aus dem Physiologischen Institut (Hallerianum) der Universität Bern.]

(Eingegangen am 26. September 1927.)

Mit 9 Abbildungen im Text.

Die im Berner Physiologischen Institut geschaffene Methode der Herstellung praktisch kohlehydratfreier Ratten ermöglichte die Inangriffnahme der Bearbeitung einer Reihe von Problemen, deren Voraussetzung eben die Kohlehydratfreiheit ist. Zu diesen Problemen gehört die viel umstrittene Frage nach der Entstehung von Zucker aus Fett.

An den nach der Berner Methode praktisch kohlehydratfrei gemachten Tieren, denen auch die Möglichkeit der Aufstapelung von Reservekohlenhydrat genommen war, hat zuerst *Calvo-Criado*[1] untersucht, ob bei Eingabe von Fett eine Mehrbildung von Zucker sich konstatieren ließ. Er fand tatsächlich als Folge einer Fettzufuhr in der Nahrung eine Steigerung der Zuckerausscheidung der unter Schilddrüsen und Phlorrhizineingabe stehenden Tiere. Er war in der Lage, durch die gleichzeitige Stickstoffbestimmung auszuschließen, daß es sich um eine aus gesteigertem Eiweißzerfall herrührende Zuckervermehrung handle. Was nicht in seinen Versuchen entschieden werden konnte, war, ob nicht die gesteigerte Zuckerausscheidung aus der Umbildung des in Fett vorhandenen Glycerins herrühre. Eine andere Möglichkeit, an die gedacht werden konnte, war die, daß unter dem Einfluß der Fetteingabe zwar nicht der Eiweißumsatz gesteigert sei, aber doch ein Teil jetzt für Zuckerbildung zur Verfügung stände, weil durch das Fett die kalorischen Bedürfnisse gedeckt würden. Es lagen in der Versuchsanordnung von *Calvo* gewisse Momente vor, welche dieser Deutung nicht den Vorzug zu geben gestatteten. Nicht unerwähnt

---

[1] *Calvo-Criado*, diese Zeitschr. **164**, 77, 1926.

mag bleiben, daß *Calvo* die günstigsten Resultate erzielte, wenn er der Nahrung ganz kleine Mengen von Zucker zufügte, viel kleinere als der vermehrten Ausscheidung entsprach. Er tat dies, um die Leber in einen günstigeren Zustand zu versetzen.

Mit den gleichen Problemen beschäftigte sich in einer allerdings etwas anderen Art *Okumura*[1]. *Okumuras* Ergebnisse waren hinsichtlich der Möglichkeit der Bildung von Zucker aus Fett weniger eindeutig als diejenigen von *Calvo*, aber er leitete doch aus einigen seiner Befunde die Möglichkeit dieser Bildung ab. Mit einer anderen Versuchsanordnung hat *Takao*[2] im Wiener Physiologischen Institut die Frage der Beeinflussung des Kohlehydratstoffwechsels durch Fettzufuhr bearbeitet. Er kommt zu dem Ergebnis, daß kein Anhaltspunkt für eine Umformung von Fettsäuren in Zucker vorliege. Daß mit negativen Ergebnissen das Problem nicht erledigt werden kann, geht aus den bemerkenswerten Betrachtungen, welche *Geelmuyden*[3] angestellt hat, hervor.

Es lag aber eine andere Veranlassung vor, nochmals auf die gleichen Untersuchungen zurückzukommen, welche *Calvo* angestellt hatte. *Calvos* Tiere befanden sich, wie gesagt, in einem Zustande hochgradiger Kohlehydratverarmung. Deshalb mußte die Frage aufgeworfen werden. ob überhaupt eine solche Leber geeignet ist, die etwaige Umwandlung von Fett in Zucker, die beispielsweise in Fällen menschlichen Diabetes von einigen Forschern trotz der Gegenkritik behauptet wird, überhaupt zu leisten. Wegen dieser Problematik mußte eine einfachere Frage zunächst in Angriff genommen werden, nämlich die, ob solche Stoffe, von denen die Zuckerbildung mehr oder weniger feststeht, auch im absolut kohlehydratfreien Tier Zucker bilden könnten. In erster Linie kam hier das Glycerin in Betracht, weil es ja ein Bestandteil des Fettes ist. Bei normalen Tieren ist in *Graham Lusks* Laboratorium die Zuckerbildung aus Glycerin mit Sicherheit nachgewiesen worden bzw. an Tieren, die nicht so abnorm waren wie die praktisch kohlehydratfreien Ratten nach dem Berner Verfahren. Einige andere Autoren sind in bezug auf die Zuckerbildung aus Glycerin weniger erfolgreich gewesen.

Aus den genannten Gründen folgte ich der Anregung von Professor *Asher*, zu untersuchen, wie sich die kohlehydratfreien Ratten in bezug auf die Zuckerausscheidung verhalten würden, wenn sie an bestimmten Versuchstagen mit der Nahrung Glycerin gereicht erhielten. Es zeigte sich, daß die methodischen Schwierigkeiten zur Bewältigung dieser Frage ganz außerordentlich große waren. Es gelang aber in einer hinreichenden Anzahl von Fällen, diese Schwierigkeit zu überwinden.

[1] *Okumura*, diese Zeitschr. **176**, 293, 1926.
[2] *T. Takao*, ebendaselbst **172**, 272, 1926.
[3] *Geelmuyden*, Ergebn. d. Physiol. **21**, 1923.

Die Methodik, derer ich mich bediente, ist die nachfolgende:

Als Versuchstiere dienten die Ratten. Insgesamt wurden 14 Tiere benutzt. Die experimentelle Erzeugung von Kohlehydratarmut geschah durch die im Berner Physiologischen Institut übliche Methode, nämlich durch die Fütterung mit reinem Fleisch, Eingabe von Pepton und Thyreoidin und Injektion von Phlorrhizin. Da eine Gefahr vorlag, durch diese mächtige Kohlehydratverarmung schwere Veränderungen der Leber und somit die Beeinträchtigung ihrer zuckerbildenden Funktion zu erzeugen, folgte ich dem Rate von Prof. *Asher*, dem Tiere noch Rohrzucker in kleinen Quantitäten (täglich 0,3 g) zu verabreichen. Pepton, Thyreoidin und Rohrzucker wurden im Mörser mit Wasser gut verrieben und mittels einer Spritze, an deren Ende ein kurzer und enger Schlauch befestigt worden war, per os gegeben. Das äußerst magere Rindfleisch wurde vor der Benutzung eine Viertelstunde lang gekocht und außerdem noch mit heißem Wasser dreimal gewaschen, um es möglichst vom Kohlehydrat zu befreien. Die Tiere erhielten täglich 20 bis 35 g.

Die Darreichung von Pepton erfolgte nur die ersten 3 bis 7 Tage, da die Ratten bei weiterer Fütterung gewöhnlich zugrunde gehen. Es wurde Pepton-*Witte* sic. puriss. benutzt. Die tägliche Menge betrug 2 g.

Als Schilddrüsenpräparat benutzte ich die Schilddrüsentabletten von Borrough Welcome & Co. (eine Tablette = 0,3 g trockene Schilddrüsen). Die Tiere erhielten während der ganzen Versuchsreihe täglich je eine Tablette.

Die Phlorrhizininjektion geschah vom sechsten oder siebenten Tage des Versuches an, wo Pepton fortgelassen wurde, um die Kohlehydratverarmung der Tiere durch Erzeugung von Phlorrhizindiabetes noch weiter zu treiben. Die Phlorrhizininjektion habe ich nach der Methode von *Coolen* nach den Angaben von *Graham Lusk*[1] gemacht, 0,5 g fein pulverisiert und in einem kleinen Mörser so lange verrieben und vermischt, bis das Gemisch gleichmäßig milchigweiß geworden ist. Dieses Gemisch wird im Wasserbad bei 60 bis 65° 2 Stunden lang sterilisiert und nach der Abkühlung subkutan injiziert. *Calvo-Criado* und *Okumura* haben gefunden, daß die günstigste noch von den Ratten vertragene Dosis 0,05 g Phlorrhizin (1 ccm obiger Flüssigkeit) beträgt. Die subkutane Injektion geschah nicht täglich, sondern Tag um Tag, manchmal wurde sogar eine zweitägige Pause ohne Phlorrhizin eingeschaltet.

Die Menge, die ich einspritzte, variierte je nach dem Gewicht und Zustande des Tieres zwischen 0,03 und 0,05 g. Im übrigen folgte ich genau den Angaben von *Calvo-Criado* und *Okumura*.

Während der Glykosurie durch Phlorrhizineinspritzung sind die Tiere sehr durstig und mußten deshalb reichlich mit Wasser versorgt werden.

Die Einspritzung, wie auch die Fütterungen wurden zwischen 10 und 11 Uhr morgens ausgeführt.

Nachdem die Tiere ihrer Kohlehydratvorräte beraubt waren, schritt ich zu der Eingabe von Glycerin, um die Frage zu entscheiden, ob die Zuckerbildung aus dem Glycerin bei dem kohlehydratfreien Tiere möglich ist.

---

[1] *Graham-Lusk*, Über Phlorrhizinglykosurie, Ergebn. d. Physiol. **12**, 315, 1912.

Es wurde die Tagesmenge des im Harn ausgeschiedenen Zuckers nach Phlorrhizininjektion mit derjenigen nach Phlorrhizininjektion + Zugabe von Glycerin verglichen. In einigen Versuchen gelang es mir mehrmals, an demselben Tiere solche Parallelvergleiche mit und ohne Glycerin zu erhalten.

In der Mehrzahl der Versuche mußte ich mich aber mit einem einzigen Vergleich begnügen. Die Tagesmenge des im Wasser gelösten und per os eingespritzten Glycerins betrug 1,0 g, die einzelnen Dosen bis 0,2 g, die Zeit zwischen zwei Einspritzungen 2 Stunden. Die Reihenfolge der Versuche war folgende: 1. Phlorrhizintag, 2. phlorrhizin- und glycerinfreier Tag, 3. Phlorrhizin- und Glycerintag, 4. phlorrhizin- und glycerinfreier Tag usw.

Die Ratten befanden sich einzeln in den im Berner Physiologischen Institut üblichen Stoffwechselkäfigen, in denen Harn und Kot getrennt aufgefangen und die Tiere rein gehalten wurden. Täglich wurden um 9 bis 10 Uhr morgens die Ratten gewogen und der abgeschiedene Harn quantitativ aufgenommen. Alles Futter wurde vor der Darreichung gewogen und am nächsten Morgen die nicht gefressenen Reste zurückgewogen. Der Harn wurde zuerst qualitativ mittels *Nylander*scher Reaktion auf Zucker geprüft, dann wurde quantitativ mit der *Folin-Wu*-Methode der Prozentgehalt bestimmt und die gesamte, in 24 Stunden ausgeschiedene Zuckermenge berechnet. Auf Eiweiß wurde stets mit Sulfosalicylsäure geprüft; wenn Eiweiß im Harn vorhanden war, wurde vorher nach *Folin* enteiweißt.

Von den 14 Ratten, die ich für meine Versuche gebraucht habe, starben fünf vor dem Beginn der eigentlichen Phlorrhizin-Glycerintage. Zwei Ratten starben schon nach der zweiten Darreichung von Pepton und Schilddrüsentabletten, sie nahmen auch keine Nahrung während dieser Zeit auf. Ratte Nr. 3 zeigte geringe Freßlust und starb nach der dritten Eingabe von Pepton-Schilddrüsentabletten.

Die anderen zwei Ratten habe ich in der Periode der Phlorrhizininjektion verloren, und zwar die eine nach der zweiten, die andere nach der dritten Injektion.

Von den Ratten, bei welchen Glycerinversuche angefangen wurden, sind fünf Ratten schon nach dem ersten Versuch unter dem Zeichen starker Abschwächung zugrunde gegangen. Drei starben infolge der durch plötzliche Änderung des Wetters hervorgerufenen Erkältung, zwei andere nach Phlorrhizininjektion am Tage, der dem phlorrhizin-glycerinfreien Tage folgte. Es war aber möglich, insgesamt an neun Tieren meine Versuche durchzuführen.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen habe ich in den nachfolgenden neun tabellarischen Übersichten und in den neun ebenfalls nachfolgenden kurvenmäßigen Darstellungen wiedergegeben. Es bedarf daher nur einer kurzen zusammenfassenden Betrachtung über die daraus erkenntlichen Ergebnisse.

Es zeigt sich ausnahmslos in allen Versuchen, in denen der Zustand der Tiere ein günstiger war, daß die Zugabe von Glycerin zur Nahrung eine merkliche Steigerung der Zuckerausscheidung unter den von mir geschilderten Bedingungen ergab. So steigerte sich bei Ratte Nr. 1 die Zuckerausscheidung durchschnittlich um 186 %, bei Ratte Nr. 2

um 36,19 %, bei Ratte Nr. 3 um 24,86 %, bei Ratte Nr. 4 um 30,86 %, bei Ratte Nr. 5 um 10,47 %, bei Ratte Nr. 6 um 22,76 %, bei Ratte Nr. 7 um 11,75 %, bei Ratte Nr. 8 um 46,41 % und bei Ratte Nr. 9 um 26,49 %. Diese maximalen Steigerungen wurden immer am Tage nach der Glycerinzufuhr festgestellt. Die kurvenmäßige Darstellung zeigt immer die Maxima, welche der Glycerindarreichung entspricht. Ich habe den Eindruck gewonnen, daß die geringfügige Zugabe von Rohrzucker, die, wie ich ausdrücklich betone, ohne Einfluß auf die Mehrsteigerung der Zuckerausscheidung bei den Glyceringaben ist, die Befähigung des Organismus: Glycerin in Zucker umzuwandeln, förderte.

Meine Versuche erbringen den noch ausstehenden Nachweis, daß von Ratten, welche nach unserer Methode praktisch kohlehydratfrei gemacht worden sind, aus Glycerin Zucker gebildet werden kann. Trotz der tiefen Veränderung, welche der Organismus erleidet, ist demnach — dies gilt zunächst nur für die Ratte — die Möglichkeit der Bildung von Zucker aus Glycerin in der Leber nicht aufgehoben. Wenn so selbst unter diesen abnormen Bedingungen einwandfrei der Nachweis der Bildung von Zucker aus Glycerin gelingt, so dürfte dies eine neue Sicherung für die zwar häufig behauptete, aber doch nicht ganz allgemein angenommene leichte Umbildung von Glycerin in Zucker sein. Weiter folgt hieraus, daß notwendigerweise bei Eingabe von Fett und bei Ausschluß anderer Bildungsmöglichkeiten von Zucker, Zucker aus Fett entstehen muß, und zwar aus der Glycerinkomponente des Fettes. Insofern bestätigen meine Untersuchungen die früheren Angaben von *Calvo*, daß die experimentell kohlehydratfrei gemachte Ratte aus Fett Zucker bilden kann; aber diese Bildung rührt nicht von den Fettsäuren, sondern von dem Glycerin her. Vergleicht man die in meiner Arbeit gefundenen Zuckerwerte mit denen, die *Calvo* bei Fettfütterung fand, so ergibt sich etwa die gleiche Größenordnung der Zuckerbildung.

Zusammengefaßt, sind die Resultate der vorstehenden Arbeit die nachfolgenden:

1. Es gelang, Ratten, die durch Fütterung mit Pepton und Schilddrüsentabletten sowie durch Phlorrhizininjektionen dauernd kohlehydratfrei gehalten wurden, Glycerin in der Nahrung zuzuführen.

2. Aus diesem Glycerin wurde Zucker gebildet.

3. Hieraus folgt, daß selbst die kohlehydratfreie Ratte aus Fett Zucker bilden kann, allerdings nur aus der Glycerinkomponente.

4. Da selbst das kohlehydratfreie Tier aus Glycerin Zucker bilden kann, dürfte das normale Tier erst recht, wie vielfach schon gelehrt wird, dazu imstande sein.

Ratte Nr. 1 (Männchen).

Fütterung: Ausgekochtes Fleisch.
Schilddrüsentablette.
Pepton *Witte* sec. (nur die ersten 7 Tage).

Versuch	Datum	Der Harn bei Phlorrhizin			Der Harn bei Phlorrhizin und Glycerin			Körpergewicht
		Menge in 24 Std.	Zucker	Gesamtmenge Zucker in 24 Std.	Menge in 24 Std.	Zucker	Gesamtmenge Zucker in 24 Std.	
Nr.	1927	ccm	%	g	g	%	g	g
8	17. III.	35	8,4210	4,2105				195,1
10	19. III.	63	7,6495	4,8192				191,1
12	21. III.	73	7,5060	5,4794				188,1
14	23. III.	89	6,3861	5,7142				184,2
16	25. III.				78	7,6942	5,9999	163,3
Durchschnitt		70	7,4907	5,0559	78	7,6942	5,9999 + 0,9440 (+ 18,61 %)	

Ratte Nr. 1 (Männchen) (Fortsetzung).

Versuch	Datum	Körpergewicht	Harn				Fütterung						Bemerkungen
Nr.	1927	g	Menge in 24 Std. ccm	Zucker in 100 ccm g	Zucker in 24 Std. g	Eiweiß	Gek. Fleisch g	Pepton *Witte* g	Schilddrüsentablette	Rohrzucker g	Glycerin	Phlorrhizin g	
1	10. III.	240,3	10	—	—	—	30	2	1				Alles gefressen
2	11. III.	223,6	28	—	—	—	30	2	1				1/3 nicht gefressen
3	12. III.	221,9	15	—	—	—	30	2	1				Ebenso
4	13. III.	198,1	13	—	—	—	30	2	1				15 g nicht gefressen
5	14. III.	196,1	17	—	—	—	30	2	1				Kl. Menge nicht gefressen
6	15. III.	216,6	17	—	—	—	25	2	1				Ebenso
7	16. III.	205,3	20	—	—	—	25	2	1			0,025	Alles gefressen
8	17. III.	195,1	35	8,4210	4,2105	—	25	—	1				Ebenso
9	18. III.	188,8	54	5,9259	3,2000	—	30	—	1			0,05	"
10	19. III.	191,1	63	7,6495	4,8192	—	30	—	1				"
11	20. III.	182,8	100	5,1282	5,1282	—	35	—	1			0,05	"
12	21. III.	188,1	73	7,5060	5,4794	—	35	—	1				Durstig
13	22. III.	180,1	120	3,7356	4,4828	—	35	—	1			0,05	Ebenso
14	23. III.	184,2	89	6,3861	5,7142	—	35	—	1				Etwas schwach
15	24. III.	175,3	74	6,9308	5,1282	—	35	—	1		9h 0,2 g 11 0,2 g 1 0,2 g 3 0,2 g 5 0,2 g } 1,0	0,05	Ebenso
16	25. III.	163,8	78	7,6942	5,9999	—	35	—	1				"
17	26. III.	150,0	47	8,0384	3,7757	—	35	—	1			0,04	Tot

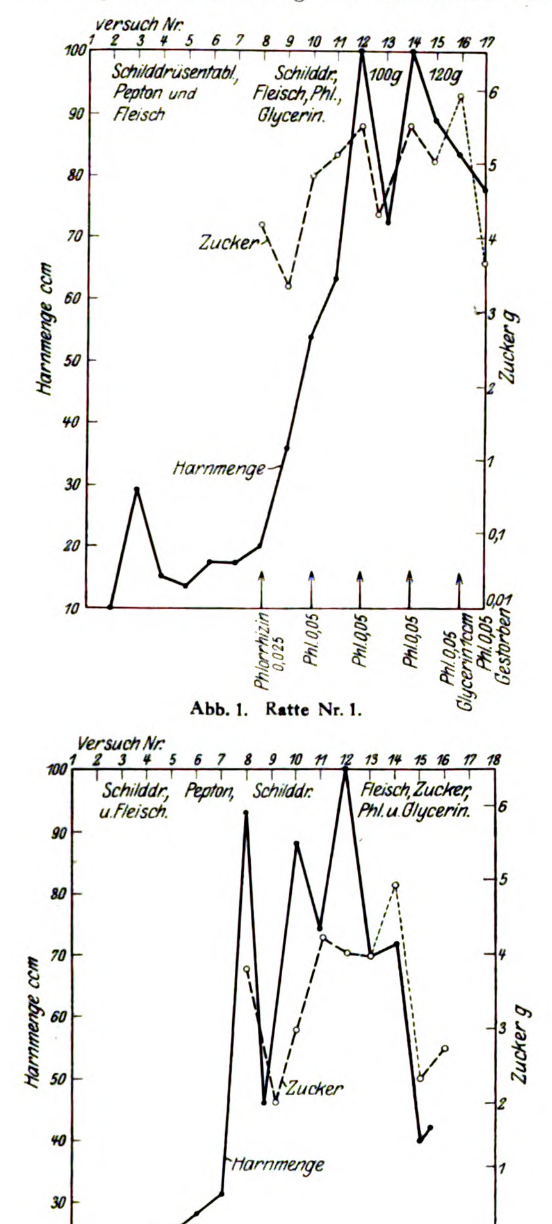


Abb. 1. Ratte Nr. 1.

Abb. 2. Ratte Nr. 2.

Ratte Nr. 2 (Männchen).

Fütterung: Ausgek. Fleisch. Schilddrüsentablette. Pepton *Witte* sec. (nur die ersten 6 Tage). Rohrzucker (v. 10. Tage an).

Versuch	Datum	Der Harn bei Phlorrhizin und Zucker			Der Harn bei Phlorrhizin, Glycerin und Zucker			Körpergewicht
		Menge in 24 Std.	Zucker	Gesamtmenge Zucker in 24 Std.	Menge in 24 Std	Zucker	Gesamtmenge Zucker in 24 Std.	
Nr.	1927	ccm	%	g	ccm	%	g	g
8	23. III.	93	4,1355	3,8461				195,2
10	25. III.	88	3,3914	2,9872				173,4
12	27. III.	101	4,0000	4,0400				160,0
14	29. III.				72	6,8586	4,9382	140,2
Durchschnitt:		71	3,8556	3,6244	72	6,8586	4,9382 + 1,3138 (+ 36,19 %)	

Versuch	Datum	Körpergewicht	Harn				Fütterung						Bemerkungen
			Menge in 24 Std.	Zucker in 100 ccm	Zucker in 24 Std.	Eiweiß	Gekocht. Fleisch	Pepton *Witte*	Schilddrüsentablette	Rohrzucker	Glycerin	Phlorrhizin	
Nr.	1927	g	ccm	g	g		g	g		g		g	
1	16. III.	177,3	—	—	—	—	30	2	1	—			10 g nicht gefressen
2	17. III.	158,2	16	—	—	—	30	2	1	—			Ebenso
3	18. III.	168,7	20	—	—	—	30	2	1	—			Linker Fuß verwundet
4	19. III.	178,9	25	—	—	—	30	2	1	—			Alles gefressen
5	20. III.	209,8	28	—	—	—	30	2	1	—			Ebenso
6	21. III.	210,6	28	—	—	—	30	2	1	—			Kl. Menge nicht gefressen
7	22. III.	208,8	93	—	—	—	30	—	1	—		0,025	Alles gefressen, durstig
8	23. III.	195,2	93	4,1355	3,8461	—	30	—	1	—			Ebenso
9	24. III.	182,5	47	4,2553	2,0000	—	30	—	1	—		0,′5	Nicht durstig
10	25. III.	173,4	88	3,3914	2,9872	—	30	—	1	0,3			Am Fuß verwundet
11	26. III.	167,5	74	5,8131	4,3014	—	30	—	1	0,3		0,05	Alles gefressen, schwach
12	27. III.	160,0	101	4,0000	4,0400	—	30	—	1	0,3			Temperatur sehr niedrig
13	28. III.	150,9	70	5,7142	4,0000	—	30	—	1	0,3	9h 0,2 g 11 0,2 g 1 0,2 g 3 0,2 g 5 0,2 g } 1,0	0,04	Temperatur sehr niedrig, alles gefressen
14	29. III.	140,2	72	6,8586	4,9382	—	30	—	1	0,3			Ebenso, sehr schwach
15	30. III.	120,0	40	5,9522	2,3209	—	30	—	1	0,8		0,04	Ebenso
16	31. III.	112,1	—	—	—	—	—	—	1	—			Abend vorher gestorben

Ratte Nr. 3 (Männchen).

Fütterung: Ausgekochtes Fleisch.
Schilddrüsentablette.
Pepton *Witte* sec. (nur die ersten 6 Tage).
Rohrzucker (vom 10. Tage an).

Versuch	Datum	Der Harn bei Phlorrhizin und Zucker			Der Harn bei Phlorrhizin, Glycerin und Zucker			Körpergewicht
		Menge in 24 Std.	Zucker	Gesamtmenge Zucker in 24 Std.	Menge in 24 Std.	Zucker	Gesamtmenge Zucker in 24 Std.	
Nr.	1927	ccm	%	g	ccm	%	g	g
8	23. III.	57	5,0124	2,8571				258,2
10	25. III.	58	6,7610	3,9214				235,7
12	27. III.	95	3,7704	3,8835				230,6
14	29. III.				93	5,3764	5,0000	226,1
16	31. III.	72	5,2411	3,7736				213,7
18	2. IV.				74	6,3592	4,7058	203,3
21	5. IV.	60	6,0116	3,6697				201,2
23	7. IV.				50	7,7670	3,8833	189,8
	Durchschnitt:	68,4	5,3393	3,6211	72,3	6,3008	4,5298	
							+ 0,9087	
							(+ 24,86 %)	

Ratte Nr. 3 (Männchen) (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Datum 1927	Körpergewicht g	Harn: Menge in 24 Std. ccm	Harn: Zucker in 100 ccm g	Harn: Zucker in 24 Std. g	Harn: Eiweiß	Fütterung: Gekocht. Fleisch g	Fütterung: Pepton *Witte* g	Fütterung: Schilddrüsentablette	Fütterung: Rohrzucker g	Fütterung: Glycerin	Fütterung: Phlorrhizin g	Bemerkungen
1	16. III.	287,5	—	—	—	—	30	2	1	—			Fleisch 10 g nicht gefress.
2	17. III.	277,5	28	—	(—)	(—)	30	2	1	—			Kl. Menge nicht gefressen
3	18. III.	271,1	27	—	—	—	30	2	1	—			Ebenso
4	19. III.	272,5	14	—	(—)	(—)	30	2	1	—			"
5	20. III.	267,1	20	—	(—)	(—)	30	2	1	—			"
6	21. III.	266,8	25	—	—	—	30	2	1	—			Alles gefressen
7	22. III.	266,6	32	—	(—)	(—)	30	—	1	—		0,025	Ebenso
8	23. III.	258,2	57	5,0124	2,8571		30	—	1	—			Kl. Menge nicht gefressen, Appetit nicht gut
9	24. III.	244,5	30	0,0294	0,0294	(—)	30	—	1	—		0,05	Kl. Menge nicht gefressen, Diarrhöe
10	25. III.	235,7	58	6,7610	3,9214		30	—	1	0,3			Alles gefressen
11	26. III.	233,6	53	6,2377	3,2000	(—)	30	—	1	0,3		0,05	Temperatur sehr niedrig
12	27. III.	230,6	95	3,7704	3,8833		30	—	1	0,3			Ebenso
13	28. III.	226,3	48	0,9918	0,7461	(—)	30	—	1		9h 0,2 g 11 0,2 g 1 0,2 g 3 0,2 g 5 0,2 g } 1,0	0,05	"
14	29. III.	226,1	93	5,3764	5,0000	—	35	—	1	0,3		0,05	Alles gefressen
15	30. III.	223,3	60	1,3080	0,7847	(—)	35	—	1	0,3			Ebenso

Ratte Nr. 3 (Männchen) (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Datum 1927	Körpergewicht g	Harn: Menge in 24 Std. ccm	Harn: Zucker in 100 ccm g	Harn: Zucker in 24 Std. g	Harn: Eiweiß	Fütterung: Gekocht. Fleisch g	Fütterung: Pepton *Witte* g	Fütterung: Schilddrüsentablette	Fütterung: Rohrzucker g	Fütterung: Glycerin	Fütterung: Phlorrhizin g	Bemerkungen
16	31. III.	213,7	72	5,2411	3,7736	—	35	—	1	0,3			Alles gefressen
17	1. IV.	210,9	48	4,0868	1,9412	(—)	35	—	1	—	9h 0,2 g 11 0,2 g 1 0,2 g 3 0,2 g 5 0,2 g } 1,0	0,05	Ebenso
18	2. IV.	203,3	74	6,3592	4,7058		35	—	1	0,3			Kl. Menge nicht gefressen, Diarrhöe
19	3. IV.	201,9	52	8,8403	4,5972	(—)	35	—	1	0,3			Ebenso
20	4. IV.	200,4	28	3,7573	1,0526		35	—	1	0,3		0,05	Appetit nicht gut, 5 g nicht gefressen
21	5. IV.	201,2	60	6,0116	3,6697	(—)	35	—	1	0,3			10 g nicht gefressen
22	6. IV.	200,2	32	5,2982	1,6956		30	—	1	0,3	9h 0,2 g 11 0,2 g 1 0,2 g 2 0,2 g 5 0,2 g } 1,0	0,05	Kl. Menge nicht gefressen
23	2. IV.	189,8	50	7,7670	3,8835	(—)	30	—	1	0,3			10 g nicht gefressen, etwas schwach
24	8. IV.	174,5	32	7,9112	2,5311		30	—	1	0,3		0,05	Schwach
25	9. IV.	170,2	10	—	—	—	—	—	—	—			24. IV. abends gestorben

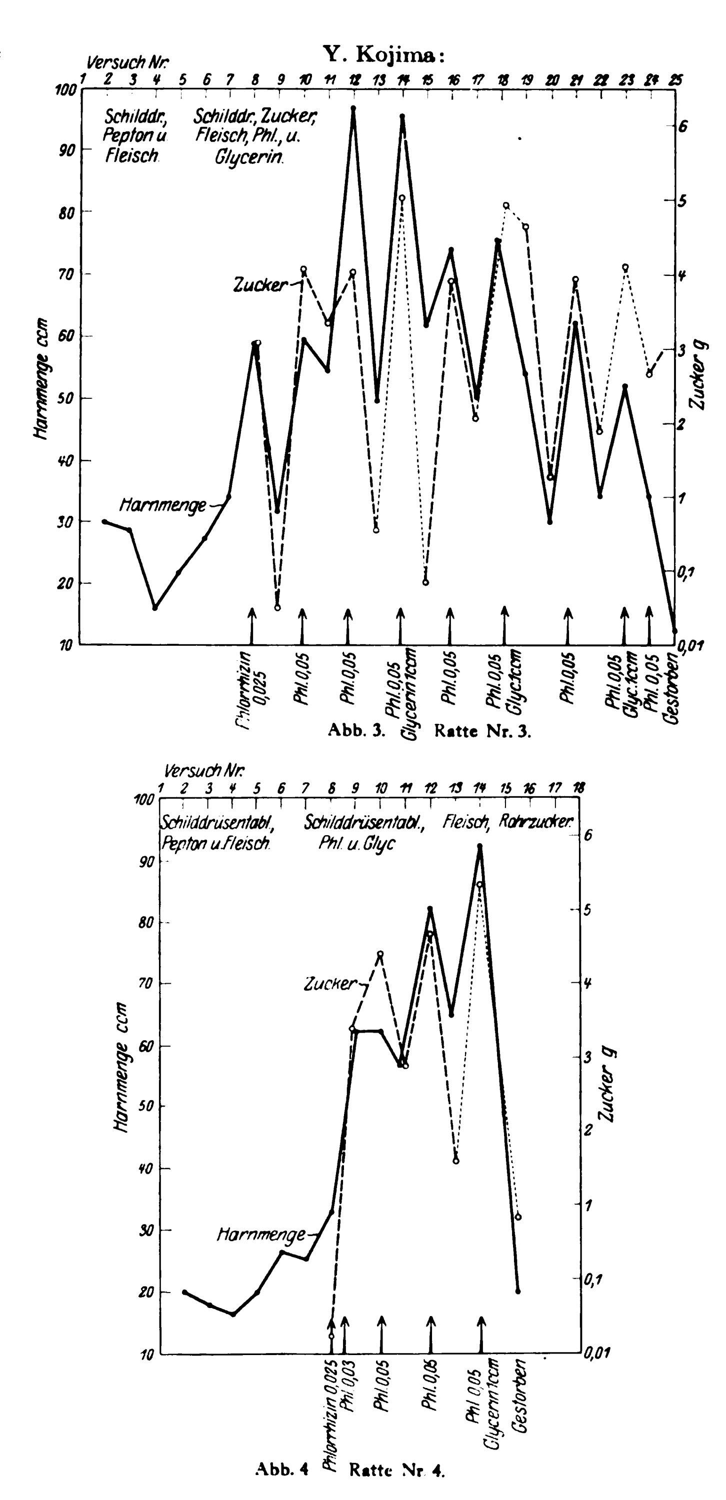


Abb. 3. Ratte Nr. 3.

Abb. 4. Ratte Nr. 4.

Ratte Nr. 4 (Männchen).

Fütterung: Ausgekochtes Fleisch. Schilddrüsentablette. Pepton *Witte* sec. (nur die ersten 6 Tage). Rohrzucker.

Versuch Nr.	Datum 1927	Der Harn bei Phlorrhizin und Zucker: Menge in 24 Std. ccm	Zucker %	Gesamtmenge Zucker in 24 Std. g	Der Harn bei Phlorrhizin, Glycerin und Zucker: Menge in 24 Std. ccm	Zucker %	Gesamtmenge Zucker in 24 Std. g	Körpergewicht g
9	24. III.	63	5,4743	3,4482				260,5
10	25. III.	63	6,9761	4,3956				247,3
12	27. III.	82	5,6719	4,7059				242,9
14	29. III.				92	5,9557	5,4794	207,9
Durchschnitt:		69	6,0708	4,1832	92	5,9557	5,4794 + 1,2962 (+ 30,86 %)	

Versuch Nr.	Datum 1927	Körpergewicht g	Harn: Menge in 24 Std. ccm	Zucker in 100 ccm g	Zucker in 24 Std. g	Eiweiß	Fütterung: Gek. Fleisch g	Pepton *Witte* g	Schilddrüsentablette	Rohrzucker g	Glycerin	Phlorrhizin g	Bemerkungen
1	16. III.	298,3	—	—	—	—	30	2	1	0,3			10 g nicht gefressen
2	17. III.	293,1	20		(—)	(—)	25	2	1	0,3			Kl. Menge nicht gefressen
3	18. III.	287,7	18		(—)	(—)	25	2	1	0,3			5 g nicht gefressen
4	19. III.	284,9	17				20	2	1	0,3			7 g nicht gefressen
5	20. III.	281,6	20		(—)	(—)	20	2	1	0,3			Kl. Menge nicht gefressen
6	21. III.	278,5	27				20	2	1	0,3			Alles gefressen
7	22. III.	272,9	26		(—)	(—)	25	—	1	0,3		0,025	Ebenso
8	23. III.	267,8	33	0,1212	0,0400	(—)	30	—	1	0,3		0,03	„
9	24. III.	260,5	63	5,4743	3,4482		30	—	1	0,3		0,05	„
10	25. III.	247,3	63	6,9761	4,3956	(—)	30	—	1	0,3			„
11	26. III.	248,6	57	5,1987	2,9629		30	—	1	0,3		0,05	„
12	27. III.	242,9	82	5,6719	4,7059	(—)	30	—	1	0,3			Temperatur sehr niedrig
13	28. III.	227,7	65	2,4946	1,6215		30	—	1	0,3	9h 0,2 g 11 0,2 g 1 0,2 g 3 0,2 g 5 0,2 g } 1,0	0,05	Alles gefressen, Temperatur niedrig
14	29. III.	207,9	92	5,9557	5.4794	(—)	30	—	1	0,3			Ebenso. Schwach
15	30. III.	192,0	20	3,8000	0,7692		30	—	1	0,3			Ebenso. Tot

Ratte Nr. 5 (Weibchen).

Fütterung: Ausgekochtes Fleisch. Schilddrüsentablette. Pepton *Witte* sec. (nur die ersten 5 Tage). Rohrzucker.

Versuch	Datum	Der Harn bei Phlorrhizin und Zucker			Der Harn bei Phlorrhizin, Glycerin und Zucker			Körpergewicht
		Menge in 24 Std.	Zucker	Gesamtmenge Zucker in 24 Std.	Menge in 24 Std.	Zucker	Gesamtmenge Zucker in 24 Std.	
Nr.	1927	ccm	%	g	ccm	%	g	g
8	2. IV.	56	6,8678	3,8462				142,0
10	4. IV.	56	6,7422	3,7757				131,7
12	6. IV.	53			53	7,9443	4,2105	118,9
Durchschnitt:		55	6,8050	3,8114	53	7,9443	4,2105 + 0,3991 (+ 10,47 %)	

Versuch	Datum	Körpergewicht	Harn				Fütterung						Bemerkungen
			Menge in 24 Std.	Zucker in 100 ccm	Zucker in 24 Std.	Eiweiß	Gekocht. Fleisch	Pepton *Witte*	Schilddrüsentablette	Rohrzucker	Glycerin	Phlorrhizin	
Nr.	1927	g	ccm	g	g		g	g		g		g	
1	26. III.	189,2	—	—	—	—	30	2	1	0,3			Kleine Menge nicht gefressen
2	27. III.	185,3	10	—	(—)	(—)	30	2	1	0,3			Ebenso
3	28. III.	175,6	11	—	(—)	(—)	30	2	1	0,3			10 g nicht gefressen
4	29. III.	171,1	13				20	2	1	0,3			Ebenso
5	30. III.	162,9	8	—	(—)	(—)	20	2	1	0,3		0,025	Ebenso. Nicht durstig
6	31. III.	149,7	34	0,0852	0,0289	(—)	20	—	1	0,3			Nicht durstig
7	1. IV.	145,2	33	1,0822	0,3571		20		1	0,3		0,04	Appetit nicht gut. Nicht durstig
8	2. IV.	142,0	34	6,8678	3,8462	—	20	—	1	0,3			Alles gefressen
9	3. IV.	138,1	33	1,9833	0,5356		20		1	0,3		0,04	7 g nicht gefressen
10	4. IV.	131,7	56	6,7422	3,7757	—	20	—	1	0,3			Kleine Menge nicht gefressen
11	5. IV.	139,3	35	5,0160	1,7346	—	25		1	0,3	9h 0,2 g 11 0,2 g 1 0,2 g 3 0,2 g 5 0,2 g } 1,0	0,03	10 g nicht gefressen, schwach
12	6. IV.	178,9	53	7,9443	4,2105	—	25	—	1	0,3			10 g nicht gefressen, geschwächt
13	7. IV.	110,2	38	5,2631	2,0000	—	20	—	1	0,3		0,03	Am Abend gestorben
14	8. IV.	109,0	15										Tot

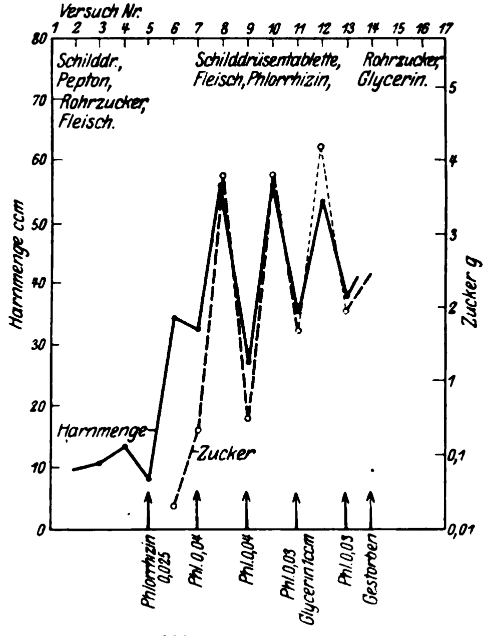



Abb. 5. Ratte Nr. 5.

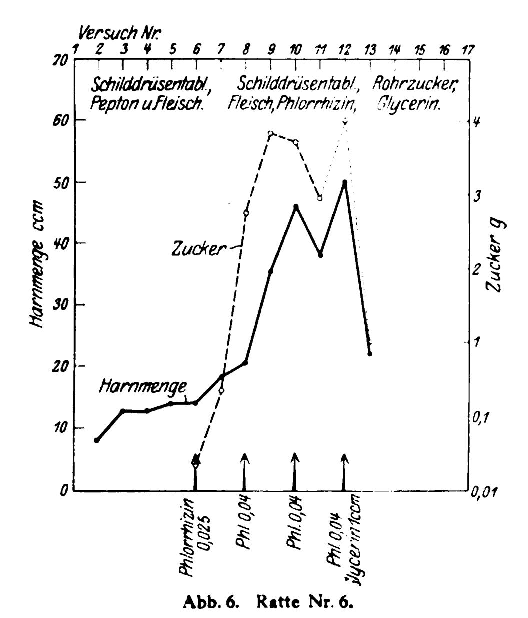


Abb. 6. Ratte Nr. 6.

Ratte Nr. 6 (Männchen).

Fütterung: Ausgekochtes Fleisch. Schilddrüsentablette. Pepton *Witte* sec. (nur die ersten 4 Tage). Rohrzucker.

Versuch	Datum	Der Harn bei Phlorrhizin und Zucker			Der Harn bei Phlorrhizin, Glycerin und Zucker			Körpergewicht
		Menge in 24 Std.	Zucker	Gesamtmenge Zucker in 24 Std.	Menge in 24 Std.	Zucker	Gesamtmenge Zucker in 24 Std.	
Nr.	1927	ccm	%	g	ccm	%	g	g
8	2. IV.	27	13,1314	2,7586				142,5
10	4. IV.	45	8,3562	3,7603				132,1
12	6. IV.				50	8,0000	4,0000	125,0
	Durchschnitt:	36	10,7438	3,2595	50	8,0000	4,0000 + 0,7405 (+ 22,76 %)	

Versuch	Datum	Körpergewicht	Harn				Fütterung						Bemerkungen
			Menge in 24 Std.	Zucker in 100 ccm	Zucker in 24 Std.	Eiweiß	Gek. Fleisch	Pepton *Witte*	Schilddrüsentablette	Rohrzucker	Glycerin	Phlorrhizin	
Nr.	1927	g	ccm	g	g		g	g		g		g	
1	26. III.	190,5	—	—	—	—	30	2	1	0,3			Nicht gut gefressen
2	27. III.	194,2	8	—	(—)	(—)	30	2	1	0,3			15 g nicht gefressen
3	28. III.	184,3	13	—	(—)	(—)	25	2	1	0,3			10 g nicht gefressen
4	29. III.	179,3	13				25	2	1	0,3			Ebenso
5	30. III.	177,7	14	—	(—)	(—)	25	—	1	0,3		0,025	Nicht durstig, kleine Menge nicht gefressen
6	31. III.	146,2	14	0,2342	0,0328	(—)	20	—	1	0,3			5 g nicht gefressen
7	1. IV.	145,3	18	1,9152	0,3448		20	—	1	0,3		0,04	Ebenso
8	2. IV.	142,5	21	13,1314	2,7586	(—)	20	—	1	0,3			7 g nicht gefressen
9	3. IV.	130,6	35	10,8628	3,8095		20	—	1	0,3		0,04	Ebenso
10	4. IV.	132,1	45	8,3562	3,7603	(—)	20	—	1	0,3			Kl. Menge nicht gefressen
11	5. IV.	131,0	38	7,5513	2,8695		25	—	1	0,3	9h 0,2 g 11 0,2 g 1 0,2 g 3 0,2 g 5 0,2 g } 1,0	0,04	Nachher etwas schwach
12	6. IV.	125,0	50	8,0000	4,0000	(—)	25	—	1	0,3			7 g nicht gefressen
13	7. IV.	110,2	20	5,6820	1,1764		25	—	1	0,8			Nicht gut gefressen

Ratte Nr. 7 (Männchen).

Fütterung: Ausgekochtes Fleisch. Schilddrüsentablette. Pepton *Witte* sec. (nur die ersten 10 Tage). Rohrzucker.

Versuch	Datum	Der Harn bei Phlorrhizin und Zucker			Der Harn bei Phlorrhizin, Glycerin und Zucker			Körpergewicht
		Menge in 24 Std.	Zucker	Gesamtmenge Zucker in 24 Std.	Menge in 24 Std.	Zucker	Gesamtmenge Zucker in 24 Std.	
Nr.	1927	ccm	%	g	ccm	%	g	g
12	10. III.	65	7,8889	5,1282				175,8
14	13. III.	67	7,4627	5,0000				174,8
16	15. III.	73	5,9739	4,8780				171,5
18	17. III.	80	5,8138	4,6511				163,2
24	23. III.	84	5,2738	4,4301				182,5
26	25. III.				70	8,4032	5,8823	176,8
28	27. III.	88	5,0505	4,5454				181,5
30	29. III.				86	6,4988	5,5890	186,8
32	31. III.	72	4,0765	4,3108				181,5
34	2. IV.				70	7,5189	5,2632	172,5
37	5. IV.	66	5,0928	3,3613				179,4
40	9. IV.				60	5,0123	3,0738	181,8
42	10. IV.	85	3,3613	2,8571				167,9
49	17. IV.	78	4,4414	3,7383				167,9
51	19. IV.	80	4,5045	3,6036				194,3
43	21. IV.				70	5,4421	3,8095	192,4
Durchschnitt:		74	4,3581	4,2276	71	6,5751	4,7235 + 0,4959 (+ 11,75 %)	

Ratte Nr. 7 (Männchen) (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Datum 1927	Körpergewicht g	Harn: Menge in 24 Std. ccm	Harn: Zucker in 100 ccm g	Harn: Zucker in 24 Std. g	Harn: Eiweiß	Fütterung: Gekocht. Fleisch g	Fütterung: Pepton *Witte* g	Fütterung: Schilddrüsentablette	Fütterung: Rohrzucker g	Fütterung: Glycerin	Fütterung: Phlorrhizin g	Bemerkungen
1	28. II.	232,9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
2	1. III.	214,6	8	—	(—)	(—)	25	2	—				Alles gefressen
3	2. III.	216,7	28	—	—	—	25	2	—				Ebenso
4	3. III.	214,3	13	—	(—)	(—)	25	2	1				Kl. Menge nicht gefressen
5	4. III.	212,4	14	—	—	—	25	2	1				Ebenso
6	5. III.	205,9	14	—	(—)	(—)	25	2	1				Alles gefressen
7	6. III.	193,6	36	—	—	—	25	2	1				Ebenso
8	7. III.	189,8	23	—	—	—	25	2	1				„
9	8. III.	187,6	30	—	(—)	(—)	25	2	1				„
10	9. III.	181,4	28	—	—	—	30	2	1				„
11	10. III.	180,4	28	—	(—)	(—)	30	2	1			0,05	„ , durstig
12	11. III.	175,8	65	7,8889	5,1282	(—)	30	—	1				Durstig
13	12. III.	174,2	59	5,6497	3,3333	—	30	—	1			0,05	Ebenso
14	13. III.	174,4	67	7,4627	5,0000	(—)	35	—	1				„
15	14. III.	174,8	65	7,2397	4,7058	—	35	—	1			0,05	„
16	15. III.	171,5	73	5,9739	4,8780	(—)	35	—	1				„
17	16. III.	169,9	68	6,0377	4,1687		35	—				0,05	Alles gefr., nicht durstig
18	17. III.	163,2	80	0,8138	4,6511	(—)	35	—	1				Alles gefressen
19	18. III.	173,8					35	—					Ebenso
20	19. III.	182,5					35	—	1				„
21	20. III.	181,2					35	—					„
22	21. III.	187,2					35	—	1				„
23	22. III.	187,7	39	3,0607	1,1937	(—)	35	—	1			0,05	„
24	23. III.	180,5	84	5,2738	4,4301		35	—	1				„ , nicht durstig
25	24. III.	182,4	85	5,6000	4,3010	(—)	35	—	1		9h 0,2 g 11 0,2 g 1 0,2 g 3 0,2 g 5 0,2 g } 1,0	0,05	„

Ratte Nr. 7 (Männchen) (Fortsetzung).

Versuch	Datum	Körpergewicht	Harn				Fütterung						Bemerkungen
Nr.	1927	g	Menge in 24 Std. ccm	Zucker in 100 ccm g	Zucker in 24 Std. g	Eiweiß	Gekocht. Fleisch g	Pepton Witte g	Schilddrüsentablette	Rohrzucker g	Glycerin	Phlorrhizin g	
26	25. III.	176,8	70	8,4032	5,8832		35	—	1	0,3			Alles gefressen
27	26. III.	186,4	65	6,5466	4,2553	(—)	35	—	1	0,3		0,05	Ebenso
28	27. III.	184,5	88	5,0505	4,5454		35	—	1	0,3			Temperatur sehr niedrig Appetit nicht gut
29	28. III.	186,7	62	4,1622	2,5806	(—)	35	—	1	0,3	9 0,2 g 11 0,2 g 1 0,2 g 3 0,2 g 5 0,2 g } 1,0	0,05	Appetit nicht gut
30	29. III.	186,8	86	6,4988	5,5890		35	—	1	0,3			Appetit gut. Temperatur sehr niedrig
31	30. III.	181,5	64	4,1666	2,6666	(—)	35	—	1	0,3		0,05	Alles gefressen
32	31. III.	181,5	72	4,0765	4,3108		35	—	1	0,3			Ebenso
33	1. IV.	175,0	64	1,4005	0,7843	+	35	—	1	0,3	9h 0,2 g 11 0,2 g 1 0,2 g 3 0,2 g 5 0,2 g } 1,0	0,05	„
34	2. IV.	172,5	70	7,5189	5,2632	+	35	—	1	0,3			Nicht durstig
35	3. IV.	175,0	28	2,1142	0,5970	+	35	—	1	0,3			10 g nicht gefressen, etwas schwach
36	4. IV.	181,1	31	0,8432	0,2614	+	35	—	1	0,3		0,05	Alles gefressen, durstig
37	5. IV.	176,6	66	5,0928	3,3613	+	35	—	1	0,3			Ebenso
38	6. IV.	179,4	82	4,3310	3,5454	+	35	—	1	0,3			„

Ratte Nr. 7 (Männchen) (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Datum 1927	Körpergewicht g	Harn: Menge in 24 Std. ccm	Harn: Zucker in 24 Std. g	Harn: Zucker in 100 ccm g	Harn: Eiweiß	Fütterung: Gekocht. Fleisch g	Fütterung: Pepton *Witte* g	Fütterung: Schilddrüsentablette	Fütterung: Rohrzucker g	Fütterung: Glycerin	Fütterung: Phlorrhizin g	Bemerkungen
39	7. IV.	175,8	52	4,6115	2,4000	+	35	—	1	0,3	9h 0,2 g 11 0,2 g 1 0,2 g 3 0,2 g 5 0,2 g } 1,0	0,05	Alles gefressen, durstig
40	8. IV.	181,8	60	5,0123	3,0738	+	35	—	1	0,3			Alles gefressen, Appetit gesteigert, durstig
41	9. IV.	164,4	74	4,0642	3,0075	+	35	—	1	0,3		0,05	Ebenso
42	10. IV.	167,9	85	3,3613	2,8571	+	35	—	1	0,3			„
43	11. IV.	172,0	64	1,0035	0,6423	+	35	—	1	0,3			„
44	12. IV.	178,1	52	1,5781	0,8206	+	35	—	1	0,3			12 g nicht gefressen
45	13. IV.	180,6	59	0,5864	0,3001	+	35	—	1	0,3			10 g „ „ schwach
46	14. IV.	179,5	52	0,4808	0,2500	+	35	—	1	0,3			Ebenso
47	15. IV.	180,0	64	0,0329	0,0211	+	35	—	1	0,3			Appetit gut, alles gefress.
48	16. IV.	176,0	60	0,0422	0,0265	+	35	—	1	0,3		0,05	Ebenso
49	17. IV.	185,5	78	4,4414	3,7383	+	35	—	1	0,3			„
50	18. IV.	189,3	60	2,2122	1,2121	+	35	—	1	0,3		0,05	„
51	19. IV.	194,3	80	4,5045	3,6036	+	35	—	1	0,3			„
52	20. IV.	194,0	74	2,9219	2,1622	+	35	—	1	0,3	9h 0,2 g 11 0,2 g 1 0,2 g 3 0,2 g 5 0,2 g } 1,0	0,05	„
53	21. IV.	192,4	70	5,4421	3,8095	+	35	—	1	0,3			Geschwächt
54	22. IV.	189,9	43	0,9007	0,4179	+	35	—	1	0,3			„

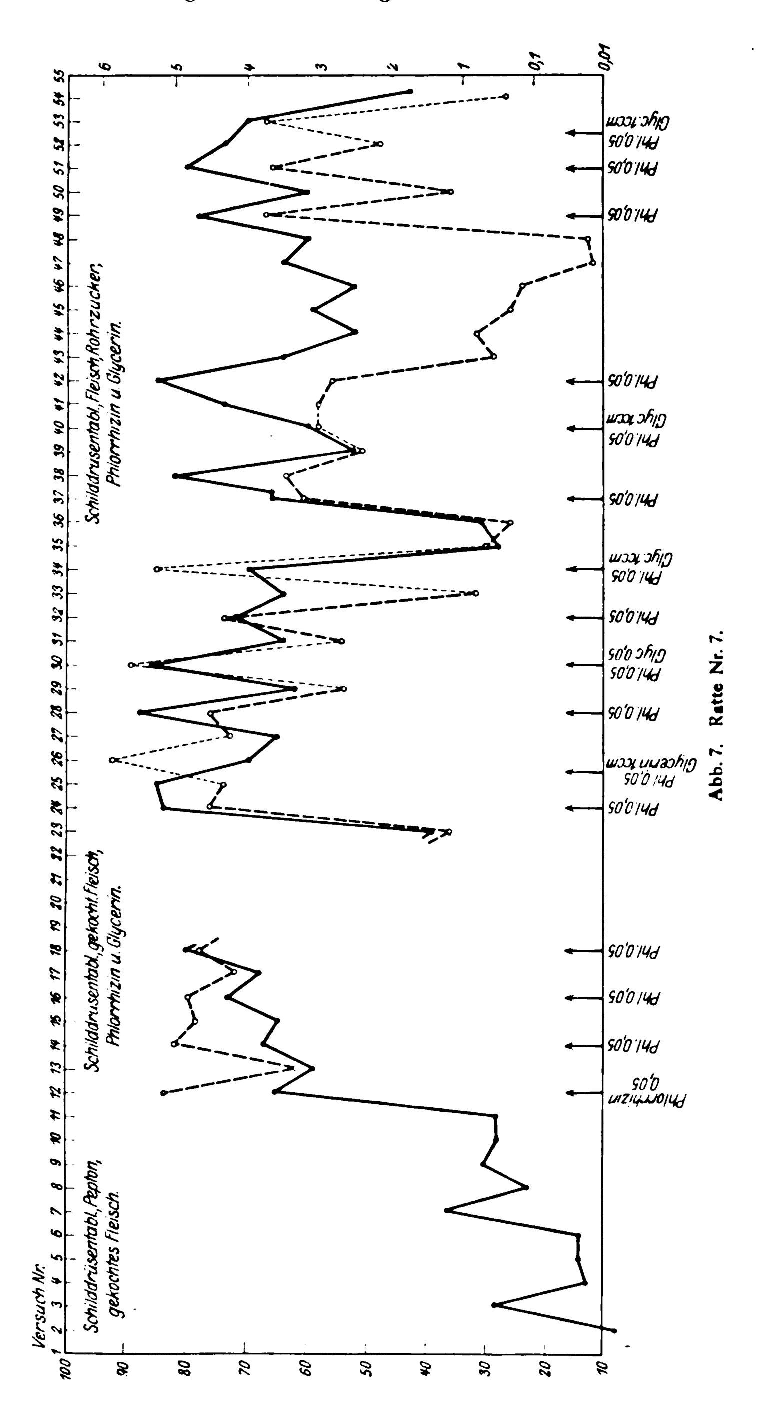


Abb. 7. Ratte Nr. 7.

Ratte Nr. 8 (Weibchen).

Fütterung: Ausgekochtes Fleisch. Schilddrüsentablette. Pepton *Witte* sec. (nur die ersten 5 Tage). Rohrzucker.

Versuch Nr.	Datum 1927	Der Harn bei Phlorrhizin und Zucker: Menge in 24 Std. ccm	Zucker %	Gesamtmenge Zucker in 24 Std. g	Der Harn bei Phlorrhizin, Glycerin und Zucker: Menge in 24 Std. ccm	Zucker %	Gesamtmenge Zucker in 24 Std. g	Körpergewicht g
10	6. IV.	38	2,9239	1,1111				131,1
12	8. IV.				39	6,6164	2,5804	144,0
14	10. IV.	40	5,9522	2,3209				117,1
16	12. IV.				59	5,4779	3,2320	113,9
18	14. IV.	58	4,0056	2,3529				112,0
21	17. IV.	56	3,8196	2,1390				100,1
Durchschnitt:		48	4,1753	1,9809	49	6,0472	2,9062 + 0,9253 (+ 46,41 %)	

Versuch Nr.	Datum 1927	Körpergewicht g	Harn: Menge in 24 Std. ccm	Zucker in 100 ccm g	Zucker in 24 Std. g	Eiweiß	Fütterung: Gekocht. Fleisch g	Pepton *Witte* g	Schilddrüsentablette	Rohrzucker g	Glycerin	Phlorrhizin g	Bemerkungen
1	28. III.	169,9	—	—	—	—	25	2	1	0,3			10 g nicht gefressen
2	29. III.	163,2	10	(—)	(—)	(—)	25	2	1	0,3			Temperatur sehr niedrig
3	30. III.	154,6	8	—	—	—	25	2	1	0,3			Ebenso
4	31. III.	146,6	5	—	—	—	20	2	1	0,3			„
5	1. IV.	142,6	6	—	(—)	(—)	20	2	1	0,3			Kl. Menge nicht gefressen
6	2. IV.	143,0	7	—	—	—	20	—	1	0,3			Schwach, kleine Menge nicht gefressen
7	3. IV.	142,5	5	—	(—)	(—)	20	—	1	0,3		0,025	Kleine Menge nicht gefressen, nicht durstig
8	4. IV.	140,6	12	0,4575	0,0549	(—)	20	—	1	0,3			Alles gefressen
9	5. IV.	139,9	11	6,4936	0,7136	—	20	—	1	0,3		0,04	Ebenso
10	6. IV.	131,1	38	2,9239	1,1111	(—)	20	—	1	0,3			„

Ratte Nr. 8 (Weibchen) (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Datum 1927	Körpergewicht g	Harn				Fütterung						Bemerkungen
			Menge in 24 Std. ccm	Zucker in 100 ccm g	Zucker in 100 ccm g	Eiweiß	Gekocht. Fleisch g	Pepton *Witte* g	Schilddrüsentablette	Rohrzucker g	Glycerin	Phlorhizin g	
11	7. IV.	133,3	28	6,7383	1,8868	—	20	—	1	0,3	9h 0,2 g 11 0,2 g 1 0,2 g 3 0,2 g 5 0,2 g } 1,0	0,04	Kleine Menge nicht gefressen, Appetit nicht gut
12	8. IV.	144,0	39	6,6164	2,5804	(—)	20	—	1	0,3			Kl. Menge nicht gefressen
13	9. IV.	124,5	11	1,3889	0,1667	—	20	—	1	0,3		0,04	Appetit gesteigert, alles gefressen, durstig
14	10. IV.	117,1	40	5,9522	2,3209	(—)	25	—	1	0,3			Alles gefressen
15	11. IV.	117,2	25	7,2728	1,8182	—	25	—	1	0,3	9h 0,2 g 11 0,2 g 1 0,2 g 3 0,2 g 5 0,2 g } 1,0	0,04	Ebenso
16	12. IV.	113,9	59	5,4779	3,2320	(—)	25	—	1	0,3			"
17	13. IV.	113,7	49	3,4589	1,6949	—	25	—	1	0,3		0,04	"
18	14. IV.	112,0	58	4,0056	2,3529	—	25	—	1	0,3			"
19	15. IV.	110,3	43	1,5660	0,6734	—	25	—	1	0,3			"
20	16. IV.	110,2	53	1,2685	0,6732	(—)	25	—	1	0,3		0,03	"
21	17. IV.	100,2	56	3,8196	1,1390	—	25	—	1	0,3			5 g nicht gefressen
22	18. IV.	90,3	30	3,8093	1,1428	—	25	—	1	0,3			Sehr schwach
23	19. IV.	80,8	5										Am Abend gestorben

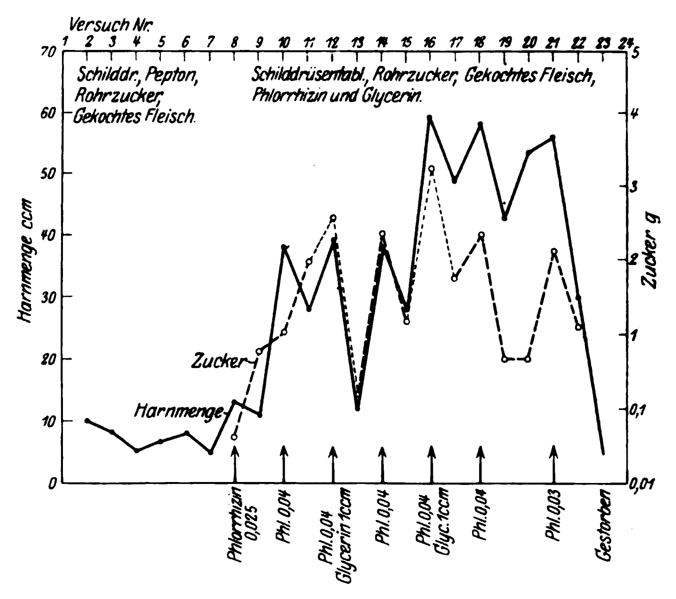


Abb. 8. Ratte Nr. 8.

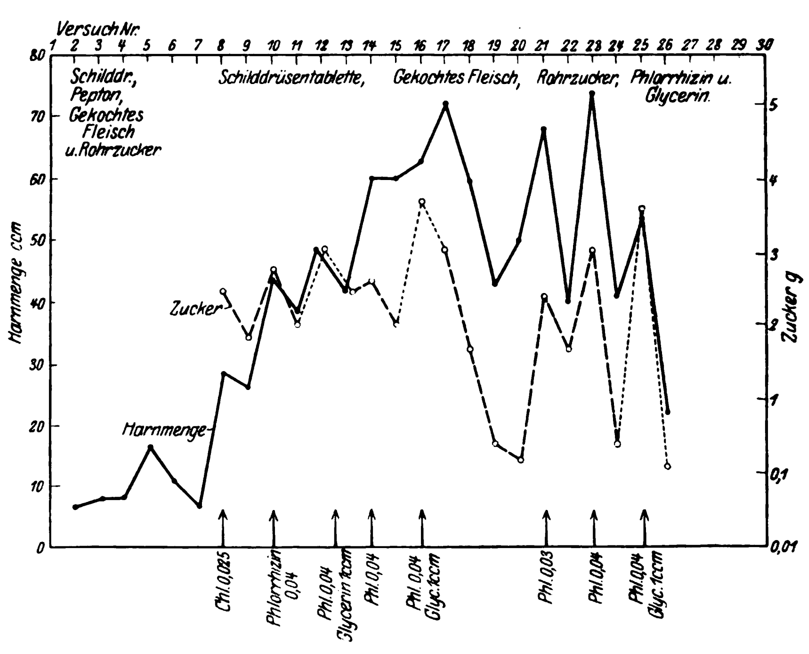


Abb. 9. Ratte Nr. 9.

Ratte Nr. 9 (Weibchen).

Fütterung: Ausgekochtes Fleisch. Schilddrüsentablette. Pepton *Witte* sec. (nur die ersten 6 Tage). Rohrzucker.

Versuch	Datum	Der Harn bei Phlorrhizin und Zucker			Der Harn bei Phlorrhizin, Glycerin und Zucker			Körpergewicht
		Menge in 24 Std.	Zucker	Gesamtmenge Zucker in 24 Std.	Menge in 24 Std.	Zucker	Gesamtmenge Zucker in 24 Std.	
Nr.	1927	ccm	%	g	ccm	%	g	g
7	4. IV.	28	8,9286	2,5000				157,5
9	6. IV.	44	6,2468	2,7586				147,4
11	8. IV.				49	6,3794	3,0769	142,3
13	10. IV.	60	4,3010	2,5806				139,3
15	12. IV.				63	5,7827	3,7431	137,1
20	17. IV.	68	3,6310	2,4691				130,0
22	19. IV.	73	4,2149	3,0769				133,6
24	21. IV.				53	6,2892	3,3333	137,1
Durchschnitt:		54	5,4638	2,6770	55	6,1504	3,3844 + 0,7074 (+ 26,49 %)	140,5

Versuch	Datum	Körpergewicht	Harn				Fütterung						Bemerkungen
			Menge in 24 Std	Zucker in 100 ccm	Zucker in 24 Std.	Eiweiß	Gek. Fleisch	Pepton *Witte*	Schilddrüsentablette	Rohrzucker	Glycerin	Phlorrhizin	
Nr.	1927	g	ccm	g	g		g	g		g		g	
1	28. III.	179,7	7	—	—	—	—	—	—	—			
2	29. III.	177,7	7	—	(—)	(—)	25	2	1	0,3			Nicht gefressen
3	30. III.	164,7	8	—	—	—	20	2	1	0,3			10 g nicht gefressen
4	31. III.	168,4	8	—	(—)	(—)	20	2	1	0,3			Ebenso
5	1. IV.	162,6	16	—	—	—	20	2	1	0,3			Kl. Menge nicht gefressen
6	2. IV.	157,6	11	—	(—)	(—)	20	2	1	0,3			Ebenso
7	3. IV.	157,4	7	—	—	—	20	2	1	0,3		0,025	7 g nicht gefressen
8	4. IV.	157,5	28	8,9286	2,5000	(—)	20	—	1	0,3			5 g nicht gefressen
9	5. IV.	150,4	26	6,9165	1,7982		20	—	1	0,3		0,04	Ebenso
10	6. IV.	147,4	44	6,2468	2,7586	(—)	20	—	1	0,3			Kl. Menge nicht gefressen

Ratte Nr. 9 (Weibchen) (Fortsetzung).

Versuch	Datum	Körpergewicht	Harn				Fütterung						Bemerkungen
			Menge in 24 Std.	Zucker in 100 ccm	Zucker in 24 Std.	Eiweiß	Gek. Fleisch	Pepton *Witte*	Schilddrüsentablette	Rohrzucker	Glycerin	Phlorrhizin	
Nr.	1927	g	ccm	g	g		g	g		g		g	
11	7. IV.	149,6	39	5,1287	2,0002	—	25	—	1	0,3	9h 0,2 g 11 0,2 g 1 0,2 g 3 0,2 g 5 0,2 g } 1,0	0,04	Kl. Menge nicht gefressen
12	8. IV.	142,3	49	6,3794	3,0769	(—)	25	—	1	0,3			Alles gefressen. Appetit gut, durstig
13	9. IV.	140,0	42	5,9714	2,5000	—	25	—	1	0,3		0,04	Alles gefressen
14	10. IV.	139,3	60	4,3010	2,5806	(—)	25	—	1	0,3			Ebenso
15	11. IV.	138,5	60	3,4683	2,0725	—	25	—	1	0,3	9h 0,2 g 11 0,2 g 1 0,2 g 3 0,2 g 5 0,2 g } 1,0	0,04	„
16	12. IV.	137,1	63	5,7827	3,7431	(—)	30	—	1	0,3			„
17	13. IV.	131,6	72	4,2734	3,0769	(—)	30	—	1	0,3			Geschwächt
18	14. IV.	131,5	60	2,8985	1,7391	(—)	30	—	1	0,3			Ebenso
19	15. IV.	130,0	43	1,5660	0,6784	—	30	—	1	0,3			„
20	16. IV.	130,2	50	0,4434	0,2217	—	30	—	1	0,3		0,03	Alles gefressen
21	17. IV.	130,0	68	3,6310	2,4691	—	30	—	1	0,3			Ebenso
22	18. IV.	128,3	40	4,2950	1,7180	(—)	30	—	1	0,3		0,04	„
23	19. IV.	133,6	73	4,2149	3,0769	—	30	—	1	0,3			„
24	20. IV.	143,9	41	1,1139	0,4562	—	30	—	1	0,3	9h 0,2 g 11 0,2 g 1 0,2 g 3 0,2 g 5 0,2 g } 1,0	0,04	„
25	21. IV.	137,1	53	6,2892	3,3338	—	30	—	1	0,8			„
26	22. IV.	136,3	22	1,3452	0,2964	—	30	—	1	0,3			Geschwächt

Fortgesetzte Untersuchungen über den Kohlehydratstoffwechsel des Zentralnervensystems.

Über den Glykogen- und den Cerebrosidgehalt des Gehirns und den Glykogengehalt des Herzens im Normalzustande und bei Sauerstoffmangel.

Von

Yuzuru Kojima.

[Aus dem Physiologischen Institut (Hallerianum) der Universität Bern.]

(Eingegangen am 26. September 1927.)

Asher und *Takahashi*[1] hatten zuerst den autonomen Kohlehydratstoffwechsel des Zentralnervensystems festgestellt. Im Anschluß an diese Arbeit sind noch mehrere auf dem gleichen Gebiete aus dem Berner Physiologischen Institut erschienen, und mit den gleichen Problemen hat sich eine wichtige Arbeit von *Hirschberg* und *Winterstein*[2] beschäftigt.

Meine nachfolgende Arbeit sollte sich mit einem der vielen Probleme beschäftigen, deren Bearbeitung durch die Aufdeckung des autonomen Kohlehydratstoffwechsels des Zentralnervensystems angeregt wurde, und ich habe mich auf Anregung von Prof. *Asher* hiermit befaßt. Das Problem, welches ich bearbeitet habe, ist das Verhalten des Kohlehydratstoffwechsels des Zentralnervensystems bei Sauerstoffmangel. Gerade der Sauerstoffmangel beansprucht ein besonderes Interesse, weil der Ablauf des Kohlehydratstoffwechsels bei Sauerstoffmangel im Skelettmuskel und in den Tumorzellen aufs genaueste untersucht worden ist und zu sehr wichtigen Aufschlüssen geführt hat.

Da nachweislich das Zentralnervensystem Glykogen und auch andere Kohlehydrate in gebundener Form besitzt, konnte daran gedacht werden, daß bei Sauerstoffmangel etwa in ähnlicher Weise Änderungen in den Kohlehydratbeständen sich vorfinden könnten, wie im Muskel und auch in der Leber. Freilich mußte andererseits

---

[1] *L. Asher* und *K. Takahashi*, diese Zeitschr. **154**, 444, 1924.
[2] *E. Hirschberg* und *H. Winterstein*, ebendaselbst **159**, 351, 1925.

von vornherein daran gedacht werden, daß die früheren Arbeiten aus dem Berner Physiologischen Institut wesentliche Unterschiede im Verhalten des Gehirnglykogens gegenüber anderen Gewebeglykogenen unter bestimmten Bedingungen beobachtet hatten. Der Plan meiner Arbeit bestand darin, den Glykogengehalt und den Cerebrosidzuckergehalt des Zentralnervensystems von Ratten zuerst im normalen Zustande und dann im Zustande des Sauerstoffmangels zu untersuchen. Aus bestimmten Gründen zog ich noch zum Vergleich die Untersuchung des Glykogengehalts des Herzens hinzu, ein Gegenstand, über welchen schon in älteren Arbeiten berichtet wird.

Die chemische Bearbeitung dieses Gegenstandes begann mit der raschen Herausnahme des Gehirns und des Herzens und Abspülen der Organe mit eisgekühltem Wasser. Die an der Oberfläche der Organe befindliche Flüssigkeit wurde mit Filtrierpapier abgesaugt. Die Organe wurden unter Eiskühlung, nachdem sie vorher gewogen worden waren, in etwa erbsengroße Stücke zerschnitten.

Zur Bestimmung des Glykogens bediente ich mich der *Pflüger*schen Methode anfänglich in der von *de Haan*[1] bei Leucocyten angewandten Form, später in der von *Winterstein* und *Hirschberg* (l. c.) am Rückenmark des Frosches als Mikromethode ausgearbeiteten Modifikation. Ich verweise auf die Veröffentlichung der zuletzt genannten Autoren, denen ich genau gefolgt bin.

In 17 Versuchen habe ich den Glykogengehalt des Gehirns und des Herzens von Ratten im Normalzustand untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche befinden sich in Tabelle I.

Es zeigt sich aus dieser größeren Versuchsreihe, daß der Glykogengehalt des Gehirns durchschnittlich 0,2266 beträgt, der Glykogengehalt des Herzens beträgt durchschnittlich 0,0829 %. Es handelt sich also im Zentralnervensystem um Mengen, die jedenfalls stoffwechselphysiologisch in Betracht kommen.

Nach Feststellung der Normalwerte schritt ich zur Ermittlung des Glykogengehaltes des Gehirns und des Herzens bei Sauerstoffmangel. Die Tiere wurden mehrfach dem Sauerstoffmangel ausgesetzt und blieben so lange in der Kammer, bis die bekannten schweren Symptome eintraten. Zu diesen schweren Symptomen gehörten nicht Krämpfe. In der nachfolgenden Tabelle II, in der sämtliche Versuchsresultate an sieben Tieren mitgeteilt sind, sind in der 5. Spalte die Anzahl von Aussetzungen an Sauerstoffmangel angegeben. Sofort nach Schluß der letzten Versuchsperiode wurden die Tiere getötet und untersucht.

In dieser Versuchsreihe beträgt der durchschnittliche Gehalt des Gehirns an Glykogen 0,2498 und der durchschnittliche Gehalt des Herzens an Glykogen 0,0816 %. Die Einzelwerte aller Versuche weichen

---

[1] *J. de Haan*, diese Zeitschr. 128, 124, 1922.

Tabelle I.
Glykogengehalt von Gehirn und Herz bei normalen Ratten.

Tier Nr.	Datum 1927	Geschlecht	Körpergewicht	Gehirn Gewicht g	Gehirn Glykogen total mg	Gehirn Glykogengehalt %	Herz Gewicht g	Herz Glykogen total mg	Herz Glykogengehalt %
1	5. I.	♀	232,70	1,8	4,3038	0,2392	0,8	0,6750	0,0840
2	6. I.	♀	220,80	1,6	3,3756	0,2109	0,85	0,6750	0,0738
3	7. I.	♀	219,30	1,75	4,7181	0,2691	0,95	0,5100	0,0537
4	7. I.	♀	232,50	1,8	4,5810	0,2542	0,80	0,5092	0,0636
5	8. I.	♂	230,10	1,8	3,5100	0,1950	0,12	0,9545	0,0852
6	10. I.	♀	210,90	1,5	3,8997	0,2590	0,7	0,6350	0,0846
7	11. I.	♂	221,80	1,67	3,2640	0,1913	0,8	0,5740	0,0718
8	12. I.	♀	210,50	1,35	2,4325	0,1802	0,6	0,5557	0,0926
9	12. I.	♀	205,42	1,5	3,7350	0,2490	0,59	0,5094	0,0863
10	13. I.	♂	236,65	1,75	4,2901	0,2437	0,81	0,4414	0,0494
11	13. I.	♀	337,05	1,7	3,8437	0,2261	0,92	1,0188	0,1107
12	14. I.	♀	247,35	1,85	4,7931	0,2598	1,08	0,5557	0,0412
13	14. I.	♂	225,80	1,6	3,1953	0,1990	1,06	0,7028	0,0663
14	15. I.	♂	236,10	1,67	3,2648	0,2015	1,02	1,1702	0,1106
15	15. I.	♂	82,40	1,4	3,0534	0,2180	0,48	0,3886	0,0809
16	17. I.	♂	199,10	1,6	2,9310	0,1803	0,76	0,8334	0,1096
17	17. I.	♂	133,80	1,51	3,1950	0,2112	0,88	0,9262	0,1051
		Durchschnitt:	210,49	1,59	3,7386	0,2266	0,82	0,6816	0,0829

Tabelle II.

Glykogengehalt des Gehirns und des Herzens von Ratten unter Sauerstoffmangel.

Tier Nr.	Datum 1927	Geschlecht	Körpergewicht g	Dauer des Verbleibens der Ratte in der Kammer unter O_2-Mangel in Minuten			Gehirn Gewicht g	Gehirn Glykogen total mg	Gehirn Glykogengehalt %	Herz Gewicht g	Herz Glykogen total mg	Herz Glykogengehalt %
					a)	b)						
1	20. I.	♂	221,6	18. III.	120	180	1,28	3,7350	0,2593	0,83	0,6002	0,0730
				19. III.	80	180						
				20. III.	120							
					zusammen 600							
2	21. I.	♂	122,5	19. III.	55	50	1,43	3,1950	0,2234	0,79	0,7408	0,0931
				20. III.	75	80						
				27. III.	142							
					zusammen 402							
3	20. I.	♂	197,4	20. III.	135	90	1,5	3,7509	0,2501	0,82	0,5092	0,0621
				21. III.	160	120						
				22. III.	350							
					zusammen 855							
4	20. I.	♀	153,0	20. I.	85	90	1,5	3,2648	0,2177	0,82	0,6020	0,0734
				21. I.	85	75						
				22. I.	80							
					zusammen 415							

Tabelle II (Fortsetzung).

Tier Nr.	Datum 1927	Geschlecht	Körpergewicht g	Dauer des Verbleibens der Ratte in der Kammer unter O_2-Mangel in Minuten			Gehirn Gewicht g	Gehirn Glykogen total mg	Gehirn Glykogengehalt %	Herz Gewicht g	Herz Glykogen total g	Herz Glykogengehalt g
					a)	b)						
				20. I.	35	60						
				21. I.	55	75						
5	24. I.	♂	174,3	22. I.	70	110	16,3	4,6125	0,2829	0,85	0,5557	0,0654
				23. I.	75	90						
				24. I.	190							
					zusammen	760						
				24. I.	135	60						
				25. I.	60	80						
6	28. I.	♀	147,0	26. I.	70	65	1,51	4,1676	0,2757	0,62	0,5092	0,0821
				27. I.	75	90						
				28. I.	80							
					zusammen	615						
				27. I.	45	70						
				28. I.	65	45						
7	31. I.	♂	122,1	29. I.	75	55	1,45	3,4716	0,2394	0,8	0,8152	0,1019
				30. I.	65	100						
				31. I.	130							
					zusammen	640						
Durchschnitt:			162,56		612		1,49	4,0282	0,2498	0,79	0,6189	0,0816

a) vorm., b) nachm.

nicht sehr von dem Durchschnittswert ab. Das klare Ergebnis dieser Reihe ist, daß der Sauerstoffmangel den Glykogenbestand des Gehirns und des Herzens nicht zu verändern vermag. Diese beiden Gewebe verhalten sich demnach ganz anders als der Skelettmuskel. Es ist nicht uninteressant, daß in dieser Beziehung der Herzmuskel dem biochemischen Verhalten des Zentralnervensystems näher steht als demjenigen des Skelettmuskels. Auch auf anderen Gebieten ist in jüngster Zeit der tiefe Unterschied im biochemischen Verhalten des Herz- und Skelettmuskels in den Arbeiten des Berner Physiologischen Instituts gezeigt worden.

Zur Trennung des Glykogens von den Cerebrosiden standen zwei Wege offen. Der erste bestand darin, daß die betreffenden Organe erst eine Stunde in kochendem Alkohol extrahiert wurden. Darauf wurde noch heiß durch ein *Schott*sches gesintertes Glas filtriert und in dem Rückstand das Glykogen in der gewöhnlichen Weise bestimmt. In dem die Cerebroside enthaltenden Filtrat wurde der Alkohol abdestilliert, der Rückstand mit Salzsäure gekocht und der abgespaltene Zucker nach *Bertrand* bestimmt. Da das Filtrieren durch ein *Schott*sches gesintertes Glasfilter mit technischen Schwierigkeiten verknüpft war, habe ich später einen zweiten Weg benutzt.

Um das Glykogen aus der Alkoholfällung abzutrennen, wurde so vorgegangen, daß diese nach Abzentrifugieren mit siedendem Wasser aufgenommen, wieder zentrifugiert und die wässerige Lösung abgegossen wurde. Dies wurde noch zweimal wiederholt. Dann wurde den vereinigten wässerigen Extrakten so viel Salzsäure zugesetzt, bis die Lösung 11 % davon enthielt. Die weitere Bestimmung geschah in der gewöhnlichen Weise. In dem Rückstand der wässerigen Extraktion, der die Cerebroside enthielt, wurde der Reduktionswert nach Kochen mit Salzsäure gleichfalls wie üblich festgestellt.

Die für meine Versuche benutzten Ratten wurden mit Milch und Brot gefüttert.

Um die Ratten dem Sauerstoffmangel auszusetzen, habe ich mich eines Verfahrens bedient, welches von *Marti*[1] in einer gemeinsamen Arbeit mit *Asher* ausgearbeitet wurde. Es handelt sich um eine geschlossene Kammer, in welcher das Tier durch seine Atmung allmählich den Sauerstoff verbraucht und die dadurch entstandene Druckabnahme durch Zufuhr von reinem Wasserstoff ausgeglichen wird. Die Kohlensäure wird dauernd durch Kalilauge absorbiert. Durch dieses Verfahren unterliegen die Tiere nur dem reinen Sauerstoffmangel, ohne daß andere Faktoren, z. B. der verminderte Druck, mitspielen.

---

[1] *Marti*, Zeitschr. f. Biol. 77, 4, 181, 1922.

Meine dritte Versuchsreihe befaßt sich mit dem Glykogen- und dem Cerebrosidzuckergehalt des Gehirns normaler Ratten. Die Ergebnisse dieser Reihe bringt Tabelle III.

Tabelle III.

Glykogen- und Cerebrosid-Zuckergehalt des Gehirns von normalen Ratten.

Tier Nr.	Datum 1927	Geschlecht	Körpergewicht g	Gehirngewicht g	Glykogen Total mg	Glykogen %	Cerebrosid Total mg	Cerebrosid %
1	3. II.	♀	121,5	1,64	3,0564	0,1857	0,9724	0,0593
2	3. II.	♂	119,5	1,67	3,8190	0,2287	0,9260	0,0554
3	4. II.	♀	116,9	1,45	2,7786	0,1916	1,2226	0,0843
4	7. II.	♀	121,5	1,44	2,7786	0,1929	1,2200	0,0849
5	8. II.	♂	119,7	1,52	3,6108	0,2375	0,7400	0,0486
6	9. II.	♀	120,3	1,62	3,8142	0,2354	0,9726	0,0600
7	10. II.	♂	132,5	1,70	3,8142	0,2243	1,1207	0,0599
Durchschnitt:			121,6	1,58	3,3815	0,2434	0,8681	0,0649

Der durchschnittliche Glykogengehalt des Gehirns, aus sieben Versuchen ermittelt, beträgt 0,2434 %, der Cerebrosidzuckergehalt 0,0649 %; der Glykogengehalt in dieser Reihe erweist sich als der gleiche wie in den früheren Reihen.

Schließlich habe ich nochmals an vier Ratten den Einfluß des Sauerstoffmangels auf den Glykogengehalt des Gehirns untersucht, um gleichzeitig auch den Cerebrosidzuckergehalt festzustellen. Die Ergebnisse dieser Versuche finden sich in Tabelle IV. Der prozentische Glykogengehalt beträgt durchschnittlich 0,234 %, und der prozentische Cerebrosidgehalt 0,0636 %.

Wiederum zeigt sich, daß der Sauerstoffmangel an den Kohlehydratbeständen des Zentralnervensystems keinerlei Veränderung hat hervorrufen können.

Es hat sich in meiner Arbeit gezeigt, daß auch gegen Sauerstoffmangel die Kohlehydrate des Gehirns außerordentlich resistent sind. *Asher* und *Takahashi* hatten die Resistenz gegenüber anderen Eingriffen gezeigt, und auch *Winterstein* hat diese Resistenz feststellen können. Die Resistenz der Kohlehydrate des Gehirns gegenüber Sauerstoffmangel, an und für sich interessant, wird noch interessanter, wenn man an die Probleme der Atmungsphysiologie denkt. Es besteht heute die Neigung, der Milchsäurebildung, namentlich derjenigen unter Sauerstoffmangel, in der Medulla oblongata eine Bedeutung für die Atemregulation zuzuschreiben. Namentlich *Gesell* tritt hierfür ein. Nun wäre es möglich, daß die Medulla oblongata sich anders verhielte als das gesamte Zentralnervensystem. Das besondere Verhalten der Medulla oblongata würde in meinen Versuchen quantitativ zurück-

Tabelle IV. Glykogen- und Cerebrosidzuckergehalt des Gehirns von Ratten unter Sauerstoffmangel.

Tier Nr.	Datum 1927	Geschlecht	Körpergewicht g	Dauer des Verbleibens der Ratte in der Kammer unter O_2-Mangel in Minuten			Gehirngewicht g	Glykogen total mg	Glykogen %	Cerebrosid total mg	Cerebrosid %
					a)	b)					
				22. III.	60	55					
				23. III.	80	80					
1	26. III.	0	167,0	24. III.	170	90	13,3	3,5045	0,2687	0,9090	0,0683
				25. III.	100	120					
				26. III.	260						
					zusammen	1015					
				23. III.	60	75					
				24. III.	150	80					
2	27. III.	0	137,5	25. III.	60	90	14,7	2,2440	0,2080	1,0200	0,0694
				26. III.	100	120					
				27. III.	155						
					zusammen	890					
				24. III.	80	60					
				25. III.	85	120					
3	28. III.	♀	137,5	26. III.	135	90	14,0	3,3381	0,2384	0,8344	0,0596
				27. III.	70	120					
				28. III.	240						
					zusammen	1000					
				25. III.	110	80					
				26. III.	80	120					
4	29. III.	♀	172,3	27. III.	120	90	17,0	3,7554	0,2209	0,9762	0,0572
				28. III.	100	70					
				29. III.	120						
					zusammen	890					
Durchschnitt:			163,5		949		14,75	3,2105	0,2340	0,9849	0,0686

a) vorm. b) nachm.

treten. Es muß jedoch noch an eine andere Möglichkeit gedacht werden, nämlich die, daß die bei Untersuchungen des Zentralnervensystems gefundene oder behauptete Milchsäure nicht von Glykogen herstammt. Über diesen wichtigen Punkt müssen eigene Untersuchungen die Entscheidung treffen. Sie ist notwendig, um Klarheit über ein Fundamentalproblem der nervösen Regulation zu erhalten.

Zusammengefaßt, sind die Ergebnisse meiner Arbeit die nachfolgenden:

1. Es wurde an normalen Ratten der Glykogengehalt des Zentralnervensystems und der Cerebrosidzuckergehalt desselben bestimmt. Die Werte, die gefunden wurden, bestätigen die aus dem Berner- und Rostocker Institut gemachten Angaben.

2. Es zeigte sich, daß der Kohlehydratgehalt des Zentralnervensystems wie auch der zum Vergleich herangezogene Kohlehydratgehalt des Herzens sehr resistent gegen Sauerstoffmangel sind.

3. Die Resistenz, die hier nachgewiesen worden ist, hat Bedeutung für den biochemischen Unterschied der beiden Gewebe gegenüber anderen Geweben und hat auch Bedeutung für die behauptete Milchsäurebildung in der Medulla oblongata als Mittel zur Regulation der Atmung bei Sauerstoffmangel.

Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Muskel und deren Zusammenhang mit Funktion und Zustandsänderung. IV.[1]

Von

Wł. Mozołowski und W. Lewiński.

Ausgeführt mit Unterstützung der Ella Sachs-Plotz Foundation.

[Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Lwów (Lemberg).]

(Eingegangen am 26. September 1927).

In dieser Mitteilung soll eine Reihe von Fragen behandelt werden, welche in vorherigen Mitteilungen[1] zu diesem Gegenstand offen geblieben sind oder sich erst im Laufe weiterer Untersuchungen ergeben haben. So soll die Größe der traumatischen Ammoniakbildung im Froschmuskel und ihre Schwankungen mit der Jahreszeit, die Ammoniakbildung im Muskel, der im intakten Organismus verbleibt und das Verschwinden des Ammoniaks aus einem solchen Muskel bestimmt werden; es soll versucht werden, die Frage nach der physiologischen Bedeutung der Ammoniakbildung und dessen Lokalisierung im Muskel zu behandeln; schließlich sollen einige Versuche über die Beeinflussung der Ammoniakbildung mitgeteilt werden.

I. Die traumatische Ammoniakbildung im Muskel.

Parnas und *Mozołowski*[2] haben in einer früheren Mitteilung die traumatische Ammoniakbildung im Froschmuskel bestimmt und an *Temporarien* und *Esculenten* in der Zeit zwischen dem 14. Januar und 10. Februar Werte gefunden, welche zwischen 3,56 und 6,7 mg-% liegen, mit dem Durschschnittswert 4,7 mg-%. Als später Bestimmungen der traumatischen Ammoniakbildung im Frühjahr an frisch gefangenen

---

[1] *Parnas* und *Mozolowski*, diese Zeitschr. 184, 399, 1927; *Parnas*, *Mozolowski* und *Lewiński*, Klin. Wochenschr. 6, 1710, 1927; diese Zeitschr. 188, 15, 1927.

[2] Diese Zeitschr. 184, 407, 1927.

Esculenten wieder aufgenommen wurden, haben wir stets höhere Werte gefunden, jedoch ohne höhere Ruhewerte. Im Juni hatte die traumatische Ammoniakbildung bereits Höchstwerte erreicht, und die Schwankungen dieser Werte in Muskeln frisch gefangener Frösche waren im Sommer nur sehr gering: so z. B. finden wir bei sechs Esculenten, die am 27. Juni frisch gefangen wurden, den traumatischen Ammoniakgehalt zwischen 7,33 und 7,78 mg-%. Nachfolgende Tabelle I enthält Werte für Muskel von Esculenten, die frisch gefangen, im April, Juni, Juli und August analysiert wurden.

Tabelle I.

Datum	Muskel	Gewicht mg	Traumatischer NH_3-N-Gehalt mg-%
25. IV.	Gastrocnemius	670	6,34
25. IV.	Adductor longus	615	5,93
25. VI.	Gastrocnemius	510	7,35
27. VI.	Peroneus und tibialis	265	7,54
27. VI.	„ „ „	292	7,61
27. VI.	Gastrocnemius	620	7,59
27. VI.	„	620	7,33
27. VI.	Peroneus und tibialis	270	7,78
8. VII.	Gastrocnemius	650	7,99
8. VII.	Peroneus und tibialis	310	7,16
26. VIII.	Gastrocnemius	585	7,87

Ruhewerte — bei Hemmung der traumatischen NH_3-Bildung durch Boraxlösung — für entsprechende Zeiten enthält die Tabelle II[1].

Tabelle II.

Datum	Muskel	Gewicht mg	NH_3-N-Gehalt mg-%
25. IV.	Gastrocnemius	670	0,68
25. IV.	Abductor longus	535	0,75
8. VII.	Gastrocnemius	650	0,51
8. VII.	Peroneus und tibialis	325	1,22
8. VII.	Gastrocnemius	675	0,55
8. IX.	„	955	0,70
10. IX.	Peroneus und tibialis	500	0,56

[1] Im Monat Mai haben wir eine Reihe von Ruhewerten an Esculenten bestimmt, die a. a. O. publiziert worden sind (Klin. Wochenschr. **6**, 1710, 1927). Umgerechnet entsprechen sie 1,1, 1,82, 0,81, 1,17, 0,69, 1,1, 1,46, 1,01, 0,86 mg-%. Wir wußten damals noch nicht, wie lange Bewegungen der Frösche auf den Ammoniakgehalt nachwirken, und die Frösche wurden ohne besondere Kautelen vor der Tötung gefangen. Später wurde dieser Faktor ausgeschaltet.

Die traumatische Ammoniakbildung im Muskel zeigt also ähnliche Schwankungen wie die Milchsäurebildung (*Fletcher* und *Hopkins*[1], *Meyerhof*[2]). Es ist von *Parnas*, *Mozolowski* und *Lewiński*[3] gezeigt worden, daß die Ammoniakbildung, ähnlich wie die Milchsäurebildung, im Froschmuskel quantitativ mit dem Energieumsatz zusammenhängt. Wenn wir annehmen, daß die traumatische Ammoniakbildung der Menge derjenigen Vorstufe proportional ist, welche, im Muskel angehäuft, während der Tätigkeit in Ammoniak zu zerfallen vermag, so bedeutet die im Sommer erhöhte, in gefangenen Winterfröschen verminderte traumatische Ammoniakbildung nichts weiter, als eine der Arbeitsfähigkeit des Muskels proportionale Größe.

Wir möchten bemerken, daß hier, wie in den früheren Abhandlungen, die traumatische Ammoniakbildung in Muskeln bestimmt wurde, welche innerhalb 15 bis 30 Sekunden mit Quarzsand und Wasser fein zerrieben wurden, 2 Minuten lang bei Zimmertemperatur gestanden und dann durch Alkalisierung mit Borat fixiert worden sind; sie stellt den unter diesen Bedingungen erreichten, in den nächsten 5 bis 10 Minuten nicht merklich ansteigenden Ammoniakgehalt dar. Wenn man indessen den Muskel mit Quarzsand ohne Wasser zerdrückt, feiner oder gröber zerschneidet usw., so findet man in der Regel niedrigere oder viel niedrigere Werte. Die traumatischen Ammoniakwerte stellen folglich relativ konstante Werte dar, welche vielleicht bei Anwendung einer schnelleren und dabei gründlicheren Zertrümmerung des Gewebes, in noch kürzerer Zeit erreicht werden könnten. Wir möchten bemerken, daß die Milchsäurebildung im Muskel in ähnlichen Versuchen bis jetzt nicht untersucht worden ist, und daß noch keine Anhaltspunkte dafür vorliegen, wie groß der Milchsäuregehalt in dem Muskelbrei sein mag, der in ähnlicher Weise behandelt worden ist[4].

II. Der Ammoniakgehalt im ruhenden Muskel.

In den Versuchen von *Parnas* und *Mozolowski*, sowie von *Parnas*, *Mozolowski* und *Lewiński* schwankte der Ammoniakgehalt frischer Froschmuskeln, auch wenn sie unter Anwendung flüssiger Luft verarbeitet wurden, in den Grenzen zwischen 0,4 und 1,1 mg-% NH_3-N. In diesen Versuchen war der Einfluß der Tötung ausgeschaltet, denn

[1] Journ. of physiol. **35**, 261, 1906/08.
[2] Pflügers Arch. **182**, 252, 1920.
[3] Klin. Wochenschr. **6**, 1710, 1927.
[4] Nachtrag bei der Korrektur: Der eine von uns (*Mozolowski*) konnte inzwischen gemeinsam mit *St. Chrzaszczewski* feststellen, daß der Milchsäuregehalt so zerriebener Muskeln nach 2 Minuten bei Zimmertemperatur gegen 0,2 % beträgt, während in gleicher Weise mit 4 % Salzsäure zerriebene gegen 0,02 % enthielten.

die Frösche wurden stets nach dem „Straßburger Verfahren" getötet[1], bei welchem durch einen Scherenschnitt das Rückenmark unmittelbar über dem Austritt des Plexus ischiadicus durchtrennt wird und die hinteren Extremitäten sofort stillgelegt werden. Wenn in einem Versuch Zuckungen der Hinterbeine auftraten, so wurde das Präparat verworfen.

Es ergab sich aus diesen Schwankungen die Frage, ob nicht etwa der Einfluß von Bewegungen auf den Ammoniakgehalt der Muskeln *in vivo* länger dauerte, als man — übrigens ohne sichere Grundlage — von vornherein glauben möchte[2]. Schon die ersten Versuche zeigten zu unserer Überraschung, daß die Ammoniakanhäufung unter dem Einfluß von Muskelzuckungen am intakten Frosch nach einer halben Stunde noch lange nicht verschwunden ist. Wenn z. B. eine frische Sommeresculenta durch Reizung mittels am Rücken angelegter Elektroden innerhalb von 2 Minuten ermüdet wurde, so enthielten die Gastrocnemien nach 15 Minuten, die das Tier frei im Wasser verbrachte, immer noch 2,33 mg-% NH_3-N. Weitere Versuche wurden in der Weise variiert, daß einem ermüdeten Frosch ein Unterschenkel zur Bestimmung des Ermüdungs-NH_3-N-Wertes amputiert wurde, und im anderen Bein später das Verschwinden des Ammoniaks bestimmt wurde. Den NH_3-N-Gehalt nach verschiedenen Zeiten gibt die Tabelle III an.

Tabelle III.

Datum	NH_3-N-Gehalt im amputierten Beine sofort nach der Reizung mg-%	Die zweite Bestimmung nach Minuten	NH_3-N-Gehalt des zweiten Beines mg-%	Temperatur des Wassers °C
3. VI.	3,73	60	2,62	24
3. VI.	3,00	60	1,64	17
4. VI.	4,25	120	1,58	14
4. VI.	2,42	90	0,94	14
4. VI.	5,09	55	2,08	14
4. VI.	3,64	30	3,13	14
7. VI.	3,19	40	2,00	18
7. VI.	1,80	150	0,60	18
8. VI.	2,16	60	0,98	16
8. VI.	2,85	60	2,40	16

Um den Einfluß der Bewegungen zwischen der ersten und zweiten Bestimmung auszuschalten, wurden die Frösche leicht narkotisiert. Wir bedienten uns einer wässerigen gesättigten Chloretonlösung[3], in

[1] Vgl. *Ewald*, Das Straßburger physiologische Praktikum. Leipzig 1914.

[2] Vgl. *Embden*, Klin. Wochenschr. **6**, 628, 1927.

[3] Trichlor-tertiär-butylalkohol (*Merck*). Wir haben die Literatur über dieses Narkoticum nicht finden können, seine Verwendung bei Wassertieren ist nach Mitteilung von Prof. *Parnas* in der Zoologischen Station in Neapel längst üblich.

welche die Tiere für 70 Sekunden hineingelegt wurden. Nach dieser Zeit wurden die Frösche in Leitungswasser versetzt, wie in vorherigen Experimenten gereizt, ein Bein zur NH_3-N-Bestimmung amputiert und die Tiere wieder in Leitungswasser (von 16° C) versetzt. Nach bestimmten Zeiten wurden sie wie gewöhnlich getötet und im zweiten Gastrocnemius der Ammoniakgehalt bestimmt. Die Werte sind in Tabelle IV enthalten.

Tabelle IV.

Datum	NH_3-N-Gehalt im amputierten Beine sofort nach der Reizung mg-%	Die zweite Bestimmung nach Minuten	NH_3-N-Gehalt des zweiten Beines mg-%
9. VI.	4,54	35	3,69
9. VI.	3,27	90	1,75
9. VI.	1,93	85	1,11
9. VI.	3,05	50	1,30
9. VI.	2,04	60	0,87
9. VI.	3,35	30	1,72
9. VI.	3,21	60	2,07
9. VI.	2,74	30	1,41

Die Feststellung, daß der Ammoniakschwund aus dem ermüdeten Muskel im intakten Organismus so sehr langsam fortschreitet, ist in mancher Beziehung von Bedeutung. Sie erklärt vor allem die schwankenden Anfangswerte. Wenn der Ammoniakgehalt des frischen Muskels in situ dem Spiel zweier Komponenten: der sehr schnellen Ammoniakbildung bei Bewegung, und dem langsamen Schwund bei der Erholung entspricht, so ist in Muskeln von Fröschen, die in einer halben Stunde von der Tötung mehr oder weniger willkürliche Bewegungen gemacht haben mögen, keine große Konstanz der „Ruhewerte" zu erwarten. Eine weitere Bedeutung dieser Feststellung liegt im Zusammenhang mit der Frage des Rückganges des Ammoniaks bei Muskeltätigkeit. Die Arbeiten dieses Laboratoriums[1] haben keine Anhaltspunkte dafür ergeben, daß die Ammoniakbildung, welche die Muskeltätigkeit begleitet, in den Vorgängen der Erschlaffung und der Erholung am isolierten Froschmuskel wieder rückgängig gemacht würde. Sie haben vielmehr sicher erwiesen, daß das im isolierten Froschmuskel einmal gebildete

[1] *Parnas* und *Mozolowski*, diese Zeitschr. **184**, 399, 1927; *Parnas, Mozolowski* und *Lewiński*, Klin. Wochenschr. **6**, 1710, 1927; diese Zeitschr. **188**, 15, 1927; *Parnas* und *Mozolowski*, Klin. Wochenschr. **6**, Nr. 21, 1927. Dagegen *Embden*, Klin. Wochenschr. **6**, 628, 1927.

Ammoniak auch nach längerer Zeit in diesem Muskel wieder gefunden werden kann, gleichgültig, ob dabei Erholung und Milchsäureschwund stattgefunden hat oder nicht. Die Feststellung, daß aus tätigen menschlichen Muskeln Ammoniak in Blut übertritt, bildet eine Grundlage für die Auffassung, daß auch im tätigen Warmblütermuskel kein Vorgang stattfindet, welcher das gebildete Ammoniak bindet. Im Gegensatz dazu meint *Embden*, daß unmittelbar nach der Muskelzuckung das im Muskel gebildete Ammoniak verschwindet, indem es in seine Vorstufe rückverwandelt wird, die ausführliche experimentelle Begründung dieser Auffassung ist jedoch bis jetzt nicht mitgeteilt worden. Die Feststellung, daß im Frosch mit intakter Zirkulation und Atmung das im Muskel angehäufte Ammoniak so lange bestehen bleibt, scheint uns jedenfalls gewichtig gegen die Richtigkeit der Auffassung von *Embden* zu sprechen.

Über den zeitlichen Verlauf des Milchsäureschwundes in den Muskeln intakter Frösche sind wir bis jetzt nicht informiert. Eine soeben erschienene Mitteilung von *Woodrow* und *Wigglesworth*[1] über Versuche an Fröschen, bei welchen durch Aufenthalt in einem Bade von 38⁰ der Milchsäuregehalt der hinteren Extremitäten auf 0,11 % gebracht worden ist, zeigen, daß der Milchsäureschwund, zumindest unter diesen Umständen, auch etwa eine halbe Stunde in Anspruch nimmt.

Wahrscheinlich sind beide Vorgänge in ihrem zeitlichen Verlauf nur von der Zirkulationsgröße abhängig. Die Langsamkeit ihres Verlaufs im Froschmuskel entspricht wohl der geringen Zahl der Kapillaren und ihrer geringeren Durchströmung und steht im klaren Gegensatz zu der großen Geschwindigkeit dieser Vorgänge — die zumindest für den Milchsäureschwund bekannt ist — im Warmblütermuskel. Es erklärt sich aus diesem Unterschied auch, daß wir in Muskeln von Warmblütern (Kaninchen, Maus, Mensch) kleinere Ammoniakwerte finden als im Kaltblütermuskel[2].

Wir haben indessen auch die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß die Abgabe des Ammoniaks durch die Muskeln irgendwie mit der Anhäufung von Milchsäure im Muskel zusammenhängen könnte; falls dem so wäre, so könnte man erwarten, daß im ermüdeten Froschschenkel das Ammoniak nur in dem Maße den Muskel verlassen könnte, als der langsame, sauerstoffverbrauchende Vorgang der Erholung fortschreitet. Um diese Annahme zu prüfen, haben wir Versuche angestellt, in welchen ermüdete, symmetrische Muskeln in sauerstoffgesättigter Ringerlösung und in sauerstoffreier Ringerlösung gehalten wurden. Es konnte in

[1] Biochem. Journ. **21**, 812, 1927.
[2] *Parnas* und *Mozołowski*, diese Zeitschr. **184**, 408, 1927.

solchen Versuchen kein Unterschied festgestellt werden zwischen der Abgabe des Ammoniaks an die Ringerlösung durch den Sauerstoffmuskel und Stickstoffmuskel. Beide schienen für das Ammoniak gleich leicht permeabel zu sein. Diese oft an verschiedenen Zellen und Geweben festgestellte Permeabilität für das Ammoniak haben wir an unserem Objekt (Rana esculenta) auch in der Weise geprüft, daß wir die Ausbreitung von in Lymphsäcke injizierten Ammoniaksalzen in der Muskulatur untersuchten. Als Injektionsflüssigkeit haben wir Ammoniumchloridlösung mit einer äquimolaren Menge Natriumbicarbonat verwendet; 1 ccm dieser Lösung enthielt 2 mg NH_3-N. Auf 100 g Körpergewicht haben wir 10 mg NH_3-N injiziert.

Die Frösche waren, wie oben, mit Chloreton narkotisiert und befanden sich in Wasser von 16°. Alle Bestimmungen waren nur an Gastrocnemien gemacht. Das Resultat gibt die Tabelle V.

Tabelle V.

NH_3-N-Gehalt in mg-%. (24. VI.)

	Nummer des Frosches			
	1	2*	3	4
Nach 15 Min.	1,66	—	—	—
„ 30 „	—	2,03	—	—
„ 45 „	—	—	4,58	—
„ 58 „	—	—	—	6,10
„ 75 „	5,29	—	—	—
„ 90 „	—	6,08	—	—
„ 110 „	—	—	5,75	—
„ 123 „	—	—	—	6,10

* Nach der Tötung des Frosches Nr. 2, das ist 90 Min. nach Injektion, bestimmten wir auch den Ammoniakgehalt in der Leber (600 mg) und haben 17,5 mg-% NH_3-N gefunden.

Tabelle V zeigt, daß in der ersten Stunde nach der Injektion der NH_3-N-Gehalt im Muskel ständig wächst und während der zweiten Stunde in allen Fröschen sich auf fast gleichem Niveau befindet. Um den absteigenden Ast der NH_3-N-Gehaltskurve zu verfolgen, haben wir in einem zweiten Versuch die NH_3-N-Bestimmungen in stündigen Intervallen gemacht; die injizierte Flüssigkeit war konzentrierter, so daß 1 ccm der NH_4Cl-$NaHCO_3$-Lösung 10 mg NH_3-N enthielt. Die Frösche befanden sich in feuchten Kammern bei 24°. Die Resultate stellt die Tabelle VI dar.

Der Verlauf dieser Versuche zeigt jedenfalls, daß die Ausbreitung des Ammoniaks, seine Anhäufung in den Muskeln und sein Verschwinden

Tabelle VI.

NH_3-N-Gehalt in mg-%. (13. VII.)

	Nummer des Frosches			
	1	2*	3	4
Nach 1 Std.	7,65	—	—	—
„ 2 „	—	6,40*	—	—
„ 3 „	—	—	4,09	—
„ 4 „	—	—	—	3,04
„ 5 „	2,78	—	—	—
„ 6 „	—	5,22*	—	—
„ 7 „	—	—	1,86	—
„ 8 „	—	—	—	1,24

* 45 Min. nach der Injektion starke Krämpfe.

in Zeiten von ähnlicher Größe vor sich geht, wie das Verschwinden des endogen gebildeten Muskelammoniaks.

III. Ammoniakbildung im kurarisierten Muskel.

Diese Gruppe von Versuchen wurde zu dem Zwecke ausgeführt, Anhaltspunkte für die Lokalisation der Ammoniakbildung während der Muskeltätigkeit zu gewinnen. Angesichts der geringen Größe der Ammoniakbildung — verglichen z. B. mit dem Kohlenhydratumsatz — konnte es nicht ausgeschlossen erscheinen, daß die Ammoniakbildung vielleicht gar nicht zum Kontraktionsprozeß des Muskels gehört, sondern zu den Vorgängen in den im Muskel verlaufenden Nervenfasern oder gar zu den motorischen Endorganen. Wir haben uns zunächst überzeugt, daß in Nerven keine traumatische Ammoniakbildung stattfindet, die doch das markanteste Phänomen im Muskel darstellt. Es wurde von einer Rana esculenta der *Nervus ischiadicus* von Plexus ischiadicus bis zum Kniegelenk präpariert; in einem solchen Nerven von 66 mg Gewicht wurde der Anfangsgehalt durch Zerreiben mit Boraxlösung bestimmt. Es wurden 3,78 mg-% NH_3-N gefunden. Im symmetrischen Nerven wurde in üblicher Weise der traumatische Ammoniakgehalt bestimmt und 3,03 mg-% gefunden.

Dann haben wir geprüft, ob Nervenreizung in einem kurarisierten Muskel Ammoniakbildung hervorruft: es war dies nicht der Fall. Die Ammoniakbildung findet also peripher von der Endplatte statt. Daß in kurarisierten Tieren stets höhere Ruhewerte gefunden wurden, als in nicht vergifteten, sei nebenbei erwähnt. Schließlich fanden wir, daß im kurarisierten Muskel die Ammoniakbildung *bei direkter Reizung*

genau so verlief, wie im nicht vergifteten Muskel bei Nervenreizung, und schließlich, daß Kurarisierung die traumatische Ammoniakbildung nicht beeinflußt. Die Werte gibt die Tabelle VII wieder.

Tabelle VII.

NH_3-N-Gehalt (Milligrammprozent) in Muskeln kurarisierter Frösche.

Datum	Direkte Muskelreizung	Nervenreizung	Ohne Reizung
4. VII.	4,0	—	2,0
4. VII.	2,83	—	0,96
4. VII.	2,64	—	1,22
5. VII.	3,09	1,42	—
5. VII.	3,20	2,03	—
6. VII.	—	1,68	2,08
6. VII.	—	2,08	2,13

IV. Wirkung des Fluorions auf die Ammoniakbildung im Muskel.

Es erschien interessant, zu untersuchen, in welcher Weise das Fluorion den Stickstoffumsatz des Muskels beeinflußt. Bekanntlich ist die Fluorwirkung auf die chemischen Vorgänge im Muskel in den letzten Jahren Gegenstand sehr eingehender Untersuchungen von *Embden* und seiner Schule[1] gewesen. Wenn auch die Erscheinungen, welche die genannten Forscher als besondere Förderungen von „Lactacidogensynthesen" aufgefaßt haben, auf Grund späterer Untersuchungen von *Meyerhof*[2] eine andere Deutung erhalten haben, so kommen hier für uns die Feststellungen in Betracht, daß das Fluorion dasjenige Anion ist, welches den Muskel in höherer Konzentration am schnellsten lähmt, andererseits in Konzentrationen von m/10 die Milchsäurebildung im Muskelbrei, unabhängig von der Pufferung, am ausgiebigsten zu hemmen vermag. Unsere Versuche ergaben folgendes: Wenn Froschmuskel mit einer n Fluornatriumlösung verrieben wird, so ist die traumatische Ammoniakbildung deutlich verlangsamt. Die Hemmung bewirkt, daß der volle traumatische Wert erst nach einer halben Stunde erreicht wird, während er bei Zerreiben mit Wasser bereits nach 2 Minuten auftritt. Eine so vollständige Hemmung, wie durch die alkalische Boraxlösung, wird durch Fluorid nicht bewirkt.

Wird dagegen ein frischer Muskel in eine Fluorid-Ringerlösung gelegt, so wird in kurzer Zeit, mit dem Eintritt der Lähmung, Ammoniak

[1] *Embden, Abraham* und *Lange*, Zeitschr. f. phys. Chem. **136, 308, 1924**; *Abraham* und *Kahn*, ebendaselbst **141**, 161, 1927.

[2] *Meyerhof*, diese Zeitschr. **178**, 482, 1926.

gebildet, und zwar genau so viel, wie bei der mechanischen Zerstörung, der Coffeinstarre, Wärmestarre usw.

Die Tabellen VIII und IX stellen die Ammoniakwerte dar, welche in den Versuchen mit n Fluornatriumlösung erhalten worden sind (6. bis 8. VII.).

Tabelle VIII.

Muskel mit NaF zerrieben in mg.⁰/₀		Symmetrischer Muskel ohne NaF in mg.⁰/₀	
Nach 2′ Boraxlösung zugesetzt .	4,41	Traumatischer NH_3-N-Gehalt .	7,70
„ 2′ „ „ .	2,43	„ „ .	6,11
„ 2′ „ „ .	4,73	—	—
„ 6′ „ „ .	4,43	Sofortige Hemmung mit Borax	1,02
„ 45′ „ „ .	8,96	—	—
Mit Boraxlösung u. NaF zerrieben	1,50	—	—

Tabelle IX.

Die Muskeln (sehr sorgfältig präpariert) während 22 Stunden in NaF-Lösung in 10° C gehalten. Symmetrische Muskeln in Ringerlösung. (8. VII.)

	Muskeln in NaF-Lösung mg.⁰/₀	Muskeln in Ringer-Lösung mg.⁰/₀
Mit Boraxlösung zerrieben	8,80	1,56
Mit Wasser zerrieben, nach 2′ Boraxlösung zugesetzt	11,0	7,84

Die Deutung dieser Versuche ist nicht schwer; die chemische Zerstörung der Muskelstruktur, die durch das ins Gewebe diffundierende Fluorion bewirkt wird, hat wie jede andere Zerstörung, welche die Gewebstrümmer nicht sofort mit hemmenden Faktoren in Kontakt bringt, eine Zersetzung der Ammoniakvorstufe zur Folge. Wenn das Fluorion ins Gewebe diffundiert, so geht seine zerstörende Wirkung auf die Struktur der an sich schwachen hemmenden Wirkung dieses Ions auf die Ammoniakbildung voraus. Die Fluorionwirkung ist hier nicht anders als die Wirkung z. B. von Alkohol bei Zimmertemperatur, welcher in einem eingelegten ganzen Muskel Milchsäurebildung hervorruft, während ein schnelles Verreiben des Muskels in Alkohol denselben Vorgang hemmt.

Zusammenfassung.

1. Die traumatische Ammoniakbildung im Froschmuskel hängt ihrer Größe nach von der Jahreszeit ab und ist im Sommer viel höher als im Winter.

2. Die „Zweiminutenwerte" für den traumatischen Ammoniakgehalt entsprechen einer sehr schnellen und vollständigen Zerreibung

mit Wasser, nicht aber einer gröberen oder feineren Zerschneidung des Gewebes.

3. In Muskeln, die im intakten normalen Frosch verbleiben, geht das bei Arbeit angehäufte Ammoniak nur langsam zurück; die Bewegungen der Tiere beeinflussen die „Ruhewerte“ innerhalb 30 bis 60 Minuten sehr deutlich.

4. Im Nervengewebe konnte keine Beeinflussung des Ammoniakgehaltes durch Zerreiben festgestellt werden. Im kurarisierten Tier bedingt die Reizung der Nerven keine Erhöhung des Ammoniakgehaltes im Muskel, direkte Reizung wirkt wie im unvergifteten Tier.

5. Fluornatrium hemmt im Muskelbrei die Ammoniakbildung, im intakten Muskel löst es eine ähnliche Ammoniakbildung aus, wie Zerreiben, Wärmestarre, Coffein.

Eine Apparatur zur graphischen Registrierung der Gärung[1].

Von

G. Joachimoglu.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 27. September 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Beim Studium der Wirkung von Giften auf die Hefegärung bin ich früher[2] so vorgegangen, daß ich die CO_2-Menge durch Wägung bestimmt habe. Das Gärgut befand sich in einem *Buchner*schen Gärkölbchen. Die Methode gibt exakte Resultate, hat aber zwei Nachteile. Will man eine größere Anzahl von Versuchen gleichzeitig anstellen, so stößt dies auf große Schwierigkeiten, weil die Wägungen dann ziemlich zeitraubend werden. Die Zeitintervalle zwischen den einzelnen Beobachtungen müssen dann entsprechend länger gewählt werden. Auch kann man aus naheliegenden Gründen die Gärung nicht längere Zeit als 10 bis 12 Stunden verfolgen.

Das Prinzip der neuen Methode beruht darauf, daß man die in den Gärkölbchen entwickelte Kohlensäure zwei mit Schwefelsäure gefüllte *Meissl*-Ventile passieren läßt und in einer als Gasometer dienenden *Mariotte*schen Flasche sammelt. Die Gasometerflasche ist mit angesäuertem Wasser gefüllt. Eventuell kann das Wasser mit CO_2 gesättigt werden. Entsprechend der entwickelten Kohlensäuremenge tropft nun das angesäuerte Wasser aus dem Kapillarrohr heraus. Die Zahl der Tropfen kann mit dem von *Gröber*[3] beschriebenen Tropfenzähler auf einem langsam laufenden Kymographion (6 Minuten = 1 cm)

---

[1] Der Apparat wurde auf der 7. Tagung der Pharmakologischen Gesellschaft am 23. September 1927 in Würzburg demonstriert.

[2] Vgl. diese Zeitschr. 130, 240, 1922.

[3] Vgl. Zeitschr. f. biol. Techn. u. Meth. 2, 148, 1912. Der Tropfenzähler kann von dem Mechaniker des Instituts. Herrn *Uhlig*, bezogen werden.

registriert werden (vgl. Abb. 1). Zur Registrierung der Zeit dient eine Uhr, die alle 6 Minuten Signale gibt. Um eine absolute Dichtigkeit der Gasometerflasche zu gewährleisten, kann man in den Raum *F* des Schliffes flüssiges Paraffin oder Hg bringen. Als Beispiel diene

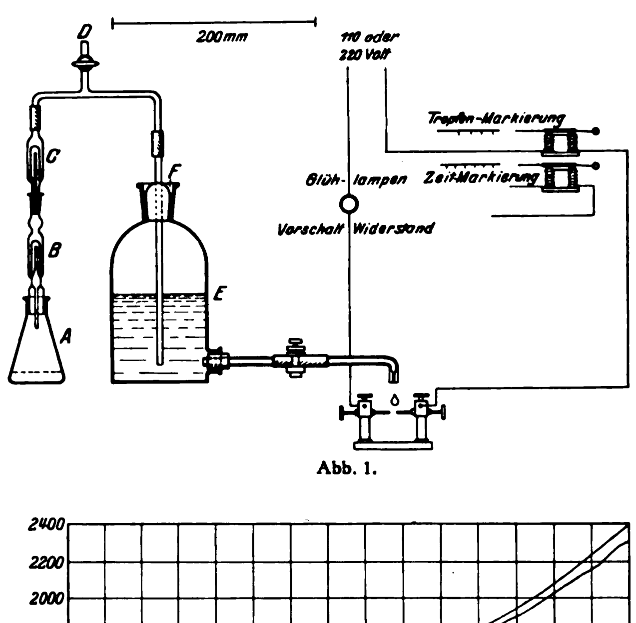


Abb. 1.

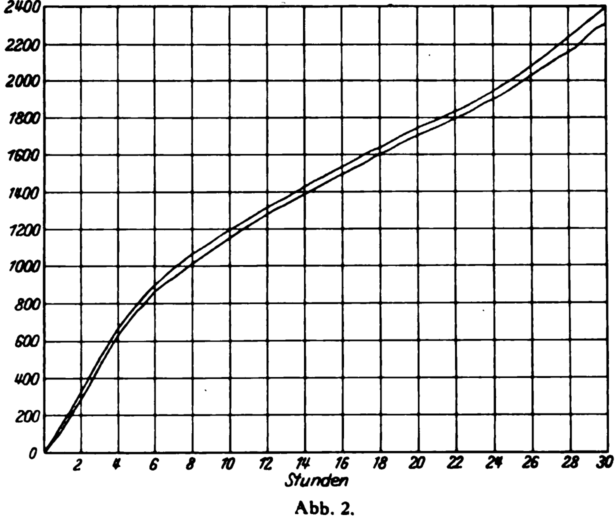


Abb. 2.

folgender Versuch. In das *Buchner*sche Gärkölbchen brachten wir 4 g Rohrzucker und 0,8 g gewöhnliche Hefe + 40 ccm Wasser. Man setzt das Ventil *B* auf das Gärkölbchen und bestimmt das Gewicht. Nach Aufsetzen des Ventils *C* stellt man die Verbindung mit der Gasometerflasche *E* her, öffnet den Hahn *D* und wartet, bis Temperatur-

ausgleich erfolgt ist. Alsdann schließt man den Hahn *D* und kann mit der Registrierung beginnen. Nach Beendigung des Versuchs wird das Gärkölbchen *A* mit dem Ventil *B* wieder gewogen und so die absolute Kohlensäuremenge bestimmt. Dividiert man diese durch die Tropfenzahl, so läßt sich berechnen, wieviel Milligramm CO_2 ein Tropfen entspricht. Für vergleichende Versuche kann das unter Umständen auch gar nicht notwendig sein. Die Abb. 2 gibt Kurven von zwei Versuchen mit der gleichen Menge Hefe und Zucker wieder. Auf der Abszisse ist die Zeit eingetragen, auf der Ordinate die Zahl der Tropfen. Die absolute Kohlensäuremenge entspricht 1,26 bzw. 1,265 g CO_2. Noch genauer werden die Resultate, wenn man für konstante Temperatur des Gärkölbchens *A* und der Gasometerflasche *E* sorgt. Man kann selbstverständlich gleichzeitig mehrere Versuche ansetzen. Wir haben hier eine Einrichtung für die Registrierung von sechs Gärversuchen. Auf einen Umstand möchte ich noch hinweisen: Das Kapillarrohr, aus dem das Wasser der Gasometerflasche *E* fließt, muß selbstverständlich in allen Versuchen die gleiche Fläche haben. Unser Glasbläser[1], von dem wir auch die anderen Glasteile bezogen haben, hat diesen Teil für die verschiedenen Apparate aus demselben Rohr angefertigt.

[1] *Bleckmann* und *Burger*, Berlin N, Auguststr. 3a.

Über die chemische Zusammensetzung der skorbutischen Meerschweinchenknochen.

Von

E. Brouwer.

(Aus der physiologischen Abteilung des Rykslandbouwproefstations in Hoorn, Holland.)

(Eingegangen am 25. September 1927.)

Vor einiger Zeit ist in einer Arbeit dieses Instituts gezeigt worden, daß das frische Gras (Lolium perenne; engl. Raigras) besonders reich an Vitamin C ist. 2 g, ja sogar 1 g Gras (Trockensubstanzgehalt etwa 400 bzw. 200 mg) pro Tag konnten die Versuchstiere (Meerschweinchen) monatelang (bis zum Abbrechen der betreffenden Versuche) vor Skorbut schützen und völlig gesund erhalten[1]. Nebenbei sind Untersuchungen über den Eisenstoffwechsel und über das Gewicht verschiedener Organe angestellt worden.

Bemerkenswert war überdies eine große Sprödigkeit der Knochen, und dieser Befund gab zu einer eingehenderen Untersuchung des *Knochenapparats* Anlaß. Die Ergebnisse dieser Feststellungen sollen jetzt besprochen werden.

Infolge der enormen Sprödigkeit der Knochen bei Skorbut nahmen wir an, daß der Kalk- und Phosphorgehalt des Knochengewebes stark vermindert und die Bilanz dieser Stoffe negativ sein würde. Später wird sich ergeben, daß diese Abnahme nur eine mäßige ist; ferner geht aus der Literatur hervor, daß man bei Skorbut nicht immer negative Bilanzen findet.

Lust und *Kloeman*[2] fanden z. B. bei einem Kinde mit schwerem Skorbut positive Phosphor- und Kalkbilanzen, sogar etwas stärker positiv als bei normalen Kindern; während der Heilung wurden diese Bilanzen stark negativ, und erst nach mehreren Wochen wurden normale Werte erreicht. *Baumann* und *Howard*[3] stellten praktisch Calcium- und Phosphorgleich-

---

[1] *Brouwer*, diese Zeitschr. **187**, 183, 1927 (auf S. 188 wird erwähnt, daß die Versuche in den Jahren 1914 und 1925 durchgeführt wurden; statt 1914 muß es jedoch heißen: 1924).

[2] *Lust* und *Kloeman*, Jahrb, f. Kinderheilk. **75**, 663, 1912.

[3] *Baumann* und *Howard*, Arch. of int. Med. **9**, 665, 1912.



gewicht bei einem Erwachsenen mit Skorbut fest. Nach Verabreichung eines Antiskorbutikums wurde die Kalkbilanz deutlich positiv, die Phosphorbilanz blieb etwa gleich. Später[1] wiederholten die Autoren diesen Versuch an Meerschweinchen und gelangten zu fast demselben Ergebnis. *Howard* und *Ingvaldsen*[2] untersuchten den Mineralstoffwechsel eines skorbutischen Affen (Macacus rhesus) und fanden im floriden Stadium eine stark positive Bilanz für Kalk und (mit einer einzigen Ausnahme) auch für Phosphor, ein Befund, der mit dem von *Lust* und *Kloeman* erhaltenen übereinstimmte. In letzter Zeit berichtete *Frank*[3] gleichfalls über die Retention von CaO und P_2O_5 bei zwei Kindern im floriden Skorbutstadium; bei der Heilung konnte eine erhöhte Ausscheidung beobachtet werden, wobei die CaO-Bilanz sogar negativ wurde.

Ebenfalls wenig übereinstimmend sind die Beobachtungen, die sich nicht auf die Mineralbilanzen erstrecken, sondern die Analysen des Knochenapparats und anderer Organe behandeln. *Bahrdt* und *Edelstein*[4] untersuchten Knochen, Leber, Nieren, Muskeln und Blut eines an Skorbut gestorbenen Kindes; sie hofften zu gleicher Zeit feststellen zu können, an welchen Stellen eine Anhäufung der nach *Lust* und *Kloeman* zurückgehaltenen mineralischen Bestandteile stattfindet. Der Trockensubstanzgehalt der Schenkelknochen war, ebenso wie bei Rachitis, bis auf die Hälfte vermindert, größtenteils auf Kosten der Asche. Die Autoren fanden nämlich nur ein Drittel bis ein Fünftel der normalen Kalk- und ein Viertel bis ein Fünftel der normalen Phosphormenge. Die Untersuchung der anderen Organe ergab nichts Bemerkenswertes; nur der Kalkgehalt der Muskeln war deutlich vermindert, noch stärker als bei Rachitis.

Ganz andere Resultate erhielten *Morel, Mouriquand, Michel* und *Thevenon*[5] bei Meerschweinchen. 100 g getrockneter Knochen enthielten:

1. bei gesunden Tieren . . . . 56,4 g Asche und 25,9 g CaO
2. „ verhungerten Tieren . . 51,4 g „ „ 25,7 g CaO
3. „ skorbutischen Tieren . . 58,2 g „ „ 26,9 g CaO.

Auch in einer zweiten Versuchsreihe von *Mouriquand, Seulier* und *Michel*[6] wurden keine auffallenden Unterschiede gefunden.

Iwabuchi[7] untersuchte ebenfalls den Knochenapparat skorbutischer Meerschweinchen. Die Röhrenknochen und die Unterkiefer wurden herauspräpariert und analysiert. Gleichzeitig gelangten zur Untersuchung die Knochen von Kontrolltieren, die außer dem Grundfutter (während 2 Stunden gekochte Milch und Haferkleie) noch 7 bis 8 g Kohlrübenpreßsaft erhalten hatten, sowie diejenigen verhungerter und „normaler" Tiere. Der Nahrung der letzteren wurde keine besondere Aufmerksamkeit geschenkt, und der Untersucher nahm an, daß das Futter dieser Tiere in jeder Beziehung genügte. Untenstehende Tabelle gibt an, wieviel CaO und P_2O_5 die Knochen der Versuchstiere enthielten.

---

[1] **Baumann** und **Howard**, Amer. Journ. med. Sc. **158**, 650, 1917.
[2] *Howard* und *Ingvaldsen*, Johns Hopk. hosp. bull. **28**, 222, 1917.
[3] *Frank*, Jahrb. f. Kinderheilk. **91**, 21, 1920.
[4] *Bahrdt* und *Edelstein*, Zeitschr. f. Kinderheilk. **9**, 415, 1913.
[5] *Morel, Mouriquand, Michel* und *Thevenon*, C. r. Soc. Biol. **85**, 469, 1921.
[6] *Mouriquand, Seulier* und *Michel*, ebendaselbst **92**, 269, 1925.
[7] *Iwabuchi*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **30**, 65, 1922.

	Skorbuttiere	Kontrolltiere	Hungertiere	Normale Tiere
CaO	16,0	18,2	16,3	19,5
P_2O_5	14,6	16,7	14,7	18,5
Trockensubstanz .	56,1	61,9	56,3	64,0

Bei den Skorbuttieren wurde also weniger CaO und P_2O_5 als bei den Kontrolltieren und den normalen Tieren gefunden. Der Unterschied ist jedoch klein, und die Zahlen der Skorbuttiere weisen eine so große Übereinstimmung mit denjenigen der Hungertiere auf, daß man annehmen könnte, die Differenz gegenüber den Kontrolltieren bestände nur infolge der Inanition, die in den letzten Skorbutstadien niemals ausbleibt.

Toverud[1] untersuchte die Schneidezähne skorbutischer Meerschweinchen. Der Aschengehalt der Trockensubstanz war von 78,6% bis auf 77,2% gesunken, der Kalkgehalt von 38,7% bis auf 35,6%. Der Magnesiumgehalt war verdoppelt (2,5 statt 1,3%), was mit der von *Baumann* und *Howard* konstatierten positiven Magnesiumbilanz übereinstimmte.

Es scheint nicht gut möglich, alle diese widersprechenden Befunde miteinander in Einklang zu bringen. Man gewinnt den Eindruck, daß die Erscheinungen, welche die Autoren als Skorbut angesprochen haben, doch nicht immer die gleichen gewesen sein können, tatsächlich war die Nahrung nicht immer so zusammengesetzt, daß man das Auftreten von reinem Skorbut erwarten konnte. Für die Fälle von Skorbut bei Menschen gilt dieser Umstand natürlich in noch stärkerem Maße.

Für uns sind im Hinblick auf eigene, unten wiedergegebene Versuche die Untersuchungen des Knochenapparats bei Meerschweinchen die wichtigsten, insbesondere die Experimente von *Iwabuchi*, da *Morel* (c. s.) und *Toverud* nur die Trockensubstanz analysierten. *Iwabuchi* bestimmte jedoch auch den Wassergehalt der Knochen. Leider war sein Versuchsmaterial nicht homogen; das Anfangsgewicht der Skorbuttiere betrug z. B. 280 g, das Anfangsgewicht der Kontrolltiere 214 g, ein Umstand, der gewiß nicht ohne Bedeutung für den Knochenapparat ist. Weiter wurde nicht darauf geachtet, daß die Tiere praktisch gleiche Mengen des Grundfutters fraßen, und es ist fraglich, ob Koprophagie vorgebeugt wurde. Auch wurden die Knochen von mehreren Tieren zusammen analysiert, so daß nicht festzustellen ist, inwieweit der Gehalt an Aschenbestandteilen bei den verschiedenen Versuchstieren schwankte.

Wir hoffen, mit unseren nachfolgend angeführten Versuchen, bei denen alle diese Punkte berücksichtigt wurden, zur Klärung der Frage nach dem Gehalt der skorbutischen Knochen an Asche und Aschenbestandteilen beitragen zu können.

[1] *Toverud*, Journ. biol. chem. 58, 583, 1923; *Howe*, Journ. Amer. med. Assoc. 79, 1567, 1922.



Eigene Versuche.

Die Versuche wurden, wie wir bemerken möchten, in der Weise ausgeführt, daß immer zwei gleichwertige Tiere, möglichst aus einem Wurfe stammend, miteinander verglichen wurden. Beim Abwiegen des Futters wurde darauf geachtet, daß beide Tiere gleiche Mengen des Grundfutters (Hafer, Heu und autoklavisierte Milch) fraßen; ein Tier bekam außerdem noch eine bestimmte Menge frisches Gras. Es ist ohne weiteres klar, daß die Versuche mit mehreren Tierpaaren angestellt werden mußten, um sichere Schlußfolgerungen ziehen zu können. Nähere Einzelheiten sind in der erwähnten Arbeit beschrieben.

Die Tiere, die nur das Grundfutter erhielten, starben fast ohne Ausnahme nach 3 bis 4 Wochen an Skorbut; die Tiere, die außerdem noch 1 oder 2 g frisches Gras pro Tag bekamen, blieben gesund. Bei einigen Versuchspaaren wurden die mit Gras gefütterten Tiere an denselben Tagen getötet, an denen die Kontrolltiere an Skorbut starben. Speziell diese Paare wurden für die chemische Untersuchung des Knochenapparats verwandt, weil die beiden Tiere jedes Paares gleiche Mengen Grundfutter gefressen hatten und, wie bereits erwähnt, auch in anderer Beziehung vollkommen vergleichbar waren. Etwas ließe sich noch bemerken. Die an Skorbut erkrankten Tiere fressen nämlich zuweilen nicht die ganzen Haferkörner (wie die gesunden Tiere), sondern ziehen es vor, die weicheren inneren Teile herauszuschälen und von den härteren Schalen eine größere oder kleinere Menge zurückzulassen. Als wir die Rationen (für beide Tiere jedes Paares) etwas kleiner wählten, wurden die Rückstände geringer und unbedeutend.

Wie andere Autoren, stellten auch wir bei den Skorbuttieren Blutergüsse fest, besonders unter der Knochenhaut der Rippen in der Nähe der Verbindungsstellen mit dem Knorpel und in den Weichteilen bei den Kniegelenken. Die Knochen waren sehr zerbrechlich, so daß ziemlich oft Spontanfrakturen bei den lebenden Tieren auftraten. Mitunter brachen die Epiphysen der Röhrenknochen beim Herauspräparieren ab. Die Backenzähne saßen sehr locker im Munde, so daß sie leicht mit einer Pinzette extrahiert werden konnten; in einigen Fällen zerbröckelten sie bei diesem Vorgehen.

Gleichfalls in Übereinstimmung mit anderen Forschern konstatierten wir bei der mikroskopischen Untersuchung der Rippen-Knorpel-Knochen-Verbindungen eine Hemmung des Knorpelzellenwachstums und der Knochenbildung. An Stelle der zierlichen Knochenbälkchen wurden nur klumpige Massen von pathologischem Knochengewebe gebildet. Auch die bekannte Fasermarkbildung (oft mit Blutergüssen) war eine typische.

blau und der von *Hári*[1] seinerzeit aus normalem Menschenharn durch Kondensation mit p-Dimethylaminobenzaldehyd kristallisiert darstellbare Farbstoff mit Skatoxyl als Paarling.

Bei der recht starken Lichtabsorption der meisten von mir untersuchten Farbstoffe konnten diese nur in starken Verdünnungen geprüft werden. Um nun einerseits nicht allzuviel von den Lösungsmitteln zu vergeuden, andererseits, um nicht allzu kleine Mengen der Farbstoffe abwägen zu müssen — was ja zu sehr bedeutenden Versuchsfehlern geführt hätte —, habe ich aus jedem Farbstoff zunächst eine recht konzentrierte Stammlösung, und erst aus dieser die geeigneten Verdünnungen bereitet. Bei der Verschiedenheit der Lichtabsorption der verschiedenen Farbstoffe war selbstredend auch die verwendete Konzentration eine verschiedene, jedoch innerhalb einer Versuchsreihe am selben Farbstoff in verschiedenen Lösungsmitteln die gleiche. Jedoch gerade um letzteres zu erreichen, mußte darauf Bedacht genommen werden, daß oft die Löslichkeit eines Farbstoffs in den verschiedenen Lösungsmitteln eine ungleiche war: gut in denen mit niederer, fortschreitend geringer in denen mit höherer C-Zahl. Demzufolge mußte oft auf eine Konzentration, die an den niederen für spektrometrische Zwecke als vorzüglich befunden war, verzichtet werden, da sie an den höheren nicht zu erreichen war.

Zu den Ablesungen diente ein *Zeiss*sches Spektrometer mit direkter Ablesung der Wellenlängen; die richtige Einstellung der Wellenlängentrommel wurde häufig mittels der Emissionslinie des Na kontrolliert.

Als Flüssigkeitsbehälter wurde eine 11 mm breite Küvette mit planparallelen Wänden benutzt, welch letztere mit dem Mittelstück nicht fest verbunden, sondern an dieses durch zwei federnde Metallspangen gedrückt wurden. Dadurch konnten die drei Teile der Küvette nach jedem Gebrauch leicht und vollständig gereinigt werden. Als Lichtquelle diente anfangs eine Nitralampe, später *Nernst*sches Licht.

Die Ablesungen erfolgten in einem Zimmer, dessen Temperatur nicht in dem Maße schwankte, daß hierdurch eine Beeinflussung der Ergebnisse hätte befürchtet werden müssen.

Eine Frage von prinzipieller Bedeutung war es, ob das Maximum je eines Absorptionsstreifens oder aber seine Ränder abzulesen seien, aus denen dann die Mitte berechnet werden konnte. Angesichts der Schwierigkeiten, ja sehr oft der Unmöglichkeit, die Stelle der maximalen Absorption festzustellen, habe ich durchweg nur die Mitte der Absorptionsstreifen aus ihren Rändern ermittelt.

Um die kaum zu vermeidenden Ablesungsfehler auf ein Minimum zu beschränken, wurden an jeder Lösung die Ränder der Absorptionsstreifen je sechsmal abgelesen; jedes einzelne der von mir als Versuchsergebnisse mitgeteilten Daten sind Mittelwerte von sechs Ablesungen.

Nicht zu vergessen sei der Versuchsfehler, hervorgerufen durch die Schwankungen in der Spannung des elektrischen Stromes der städtischen Leitung, durch den die Nitra- bzw. Nernstlampe gespeist wurde. Zu den Stunden, wo sich (in der Winterzeit) grobe, ohne weiteres bemerkbare Schwankungen zeigten, wurde überhaupt nicht abgelesen. Jedoch war die Netzspannung, daher auch die Intensität des Lichtes, auch sonst bald schwächer, bald stärker, was auch eine Änderung der Absorptionsstreifen zur Folge haben konnte, sei es bezüglich ihrer Breite, sei es — an asymmetrischen

---

[1] *P. Hári*, diese Zeitschr. **117**, 41, 1921; **168**, 453, 1926.

Streifen — bezüglich der Lage ihrer Mitte. Die auf diese Weise entstandenen Versuchsfehler waren aber nicht danach, daß sie die Versuchsergebnisse erheblich hätten beeinflussen können; immerhin konnten sie die Ursache der bemerkbaren, sonst kaum zu begründenden Schwankungen abgeben.

In den mit * bezeichneten Versuchen waren im Gegensatz zu den anderen derselben Reihe statt eines Streifens deren zwei zu beobachten, wobei aber namentlich ihre einander zugekehrten Ränder sehr verwaschen waren. Die Ergebnisse dieser Versuche wurden aus den voneinander abgekehrten Rändern der beiden Streifen berechnet, wie wenn es nur *einen* gegeben hätte.

Die Daten sämtlicher Versuche sind in der Generaltabelle am Ende des Textes enthalten; die aus der letzteren gezogenen Folgerungen sind durch Abbildungen erläutert.

B. Verschiebung der Absorptionsstreifen in homologen Lösungsmitteln bei identischer Farbstoffkonzentration.

Durch die *Kundt*sche[1] Regel wird folgendes ausgesprochen: „Hat ein farbloses Lösungsmittel ein beträchtlich größeres Brechungs- und Dispersionsvermögen als ein anderes, so liegen die Absorptionsstreifen einer in den Medien gelösten Substanz bei Anwendung des ersten Mittels dem roten Ende des Spektrums näher als bei Benutzung des zweiten.“ Während *Formánek*[2] von 910 diesbezüglich geprüften Farbstoffen die *Kundt*sche Regel nur an etwa der Hälfte derselben bestätigt fand und von *Walther*[3] das Umbelliferon, von *Adinolfi*[4] das Rhodamin B und das Uranin als Farbstoffe hervorgehoben werden, die jenem Gesetze nicht folgen, wurde sie von einer ganzen Reihe anderer Autoren: *Voigt*[5], *Sheppard*[6], *Havelock*[7] und *Kazay*[8] bestätigt und auf verschiedene Weise zu erklären versucht.

Auch in unserem Institut wurde über derlei Versuche berichtet und von *Szilárd*[9] die *Kundt*sche Regel am Hämatoporphyrin für normale Alkohole, für Äthylester, für Benzole bestätigt, daneben aber gefunden, daß z. B. je ein normaler und isomerer Alkohol mit verzweigter C-kette zwar angenähert dasselbe molekulare Brechungsvermögen haben, die Lage der vier Absorptionsstreifen des in ihnen

---

[1] *Kundt*, Wied. Ann. **4**, 34, 1878.

[2] *J. Formánek*, Untersuchung und Nachweis organischer Farbstoffe auf spektroskopischem Wege.

[3] *B. Walther*, Drude Ann. **17**, 369.

[4] *E. Adinolti*, Chem. Centralbl. **1923**, I, 194.

[5] *W. Voigt*, Drude Ann. **6**, 501.

[6] *E. Sheppard*, Chem. Centralbl. **1909**, II, 74 (Proc. Roy. Soc. London, Serie A, **82**, 256 bis 270).

[7] *T. H. Havelock*, ebendaselbst **1912**, I, 633 (Proc. Roy. Soc. London, Serie A, **86**, 16 bis 20).

[8] *E. v. Kazay*, ebendaselbst **1907**, II, 773 (Pharm. Post **40**, 531 bis 533).

[9] *A. Szilárd*, diese Zeitschr. **170**, 185, 1926.

gelösten Hämatoporphyrins aber *nicht* dieselbe ist und auch von Streifen zu Streifen in verschiedenem Maße und in verschiedenem Sinne verschoben sein kann. Dasselbe fand *Szilárd* auch bei Verwendung von normalen Alkoholen einerseits und von Äthylestern mit derselben C-Zahl andererseits, auch, wenn sie dasselbe molekulare Brechungsvermögen hatten.

Gleichfalls in unserem Institut wurde von *Kurelec*[1] das Verhalten der Absorptionsstreifen des Kaliumpermanganats und des Uranylacetats geprüft und gefunden, daß die Streifen des ersteren in verschiedenen organischen, homologen Lösungsmitteln mit ansteigender C-Zahl *rotwärts* und nur in starken organischen Säuren violettwärts verschoben werden. Genau entgegengesetzt verhielten sich die Absorptionsstreifen des Uranylacetats, indem sie unter den oben genannten Umständen meistens eine *violettwärts* und nur ausnahmsweise eine rotwärts gerichtete Verschiebung aufwiesen.

Aus meinen eigenen Versuchen geht eine Bestätigung der *Kundt*schen Regel hervor[2], indem es von den 21 untersuchten Farbstoffen

a) bloß einen, *Sudanrot III*, gab, an dem die Streifenmitte in den verschiedenen Lösungsmitteln keine oder bloß eine minimale *Verschiebung* aufwies;

b) bloß einen, die *Skatoxylverbindung*, an dem die Streifenmitte in jedem folgenden Lösungsmittel mit höherer C-Zahl *violettwärts* verschoben war;

c) drei Farbstoffe, *Diamantgrün*, *Methylengrün* und *Patentblau*, in denen die Streifenmitte beim Übergang von Methyl- zu Äthylalkohol; einen Farbstoff, *Methylengrün*, an dem sie auch beim Übergang von Propyl- zu Butylalkohol; und einen Farbstoff, *Chinolinblau*, an dem sie beim Übergang von Butyl- zum Amylalkohol *violettwärts* sich verschob.

In allen anderen weit zahlreicheren Fällen fand beim Übergang zum nächst höheren homologen Alkohol eine Verschiebung der Streifenmitten nach dem roten Spektralende statt.

Das Ausmaß dieser Verschiebung war ein verschiedenes je nach dem Farbstoff, je nach dem verglichenen Lösungsmittelpaar und auch je nach der verwendeten Farbstoffkonzentration. Sehr häufig betrug die Verschiebung nicht mehr als 1 bis 2 $\mu\mu$, am Alkaliblau allerdings bis zu 5, am Capriblau gar bis zu 11 $\mu\mu$ beim Übergang vom Methylzum Äthylalkohol.

---

[1] *V. Kurelec*, diese Zeitschr. 180, 65, 1927.

[2] Da ich mangels der richtigen Homologen auch Isobutyl- und Isoamylalkohole verwenden mußte, sind meine Befunde mit den *Kundt*schen nicht streng vergleichbar.



Ohne mich etwa in die tieferen physikalischen Ursachen dieser Verschiebungen einzulassen, sei hier bloß auf folgende Zusammenhänge verwiesen. Da nämlich, wie eingangs erwähnt, nicht die Stellen der maximalen Absorption, sondern die Lage der Streifenränder abgelesen und aus dieser Lage die Streifenmitte berechnet wurde, ist es klar, daß letztere ausschließlich durch die Lage der Ränder bestimmt war. Dann liegen aber folgende Möglichkeiten vor:

a) *Eine Verschiebung der Streifenmitte findet überhaupt nicht statt,*

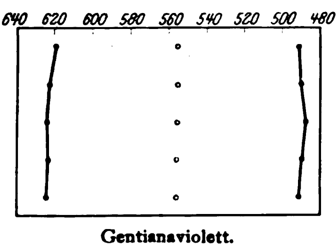
α) wenn die Streifenränder in den verschiedenen Lösungsmitteln ihre Lage nicht ändern, daher auch die Breite der Streifen unverändert bleibt;

β) wenn die Streifenbreite von Lösungsmittel zu Lösungsmittel wechselt, dabei aber der linke und der rechte Streifenrand gleich stark und in entgegengesetzter Richtung wegrücken;

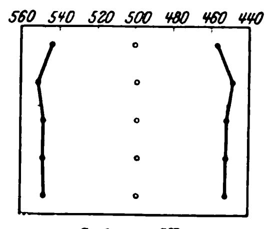
b) *Die Streifenmitte muß sich verschieben,*

γ) wenn der Streifen zwar von Lösungsmittel zu Lösungsmittel gleich breit bleibt, dabei jedoch seine Ränder gleich stark und in derselben Richtung wegrücken;

δ) wenn eine veränderliche Streifenbreite dadurch bewirkt wird, daß sich die beiden Ränder ungleich stark verschieben.



Gentianaviolett.



Sudanrot III.

Abb. 1.

Suchen wir nun festzustellen, wie sich die von mir geprüften Farbstoffe diesbezüglich verhielten, so ergibt sich, daß

Fall α) in meinen Versuchen überhaupt nicht vorkam;

Fall β) traf am ausgesprochensten an der 0,02%igen Lösung von *Gentianaviolett* und an der 0,009%igen Lösung von *Sudanrot III* zu (Abb. 1[1]);

---

[1] Die Lage der Streifenränder ist hier wie in den übrigen Abbildungen durch Punkte, die der Streifenmitte durch Ringe angedeutet; die von oben nach unten einander folgenden Punkte bzw. Ringe gehören der Reihe nach dem Methyl-, Äthyl-, Propyl-, Isobutyl- und Isoamylalkohol an.

Für die chemische Untersuchung dienten zunächst die Tibien der folgenden Paare: C 30 und C 31, C 32 und C 33, C 36 und C 37, C 38 und C 39. Wie bereits erwähnt, hatten die beiden Tiere jedes Paares gleiche Mengen Grundfutter bekommen; die Tiere, die außerdem noch 1 g (C 37 und C 39) oder 2 g (C 30 und C 33) frisches Gras pro Tag bekamen, wurden an denselben Tagen (mit Chloroform) getötet, an denen die Kontrolltiere an Skorbut starben.

In jeder Tibia bestimmten wir die Trockensubstanz (Trocknung bei 105° C), die Glühasche und den Gehalt an CaO (gravimetrisch) und P_2O_5 (Methode fast gleich der von *Bell-Doisy-Briggs*). In den Fällen, in denen sich die Epiphysen der kranken Tiere beim Herauspräparieren lösten, kann möglicherweise ein sehr geringer Verlust an Knochenmark stattfinden, daher ist das Gewicht der ungetrockneten Knochen vielleicht um einige Milligramme zu niedrig gefunden worden. Es ergibt sich somit, daß die Prozentzahlen, die den Gehalt der ungetrockneten Knochen an Trockensubstanz und Asche angeben, eher etwas zu hoch als zu niedrig sind. Dennoch lagen diese Werte für die kranken Tiere niedriger als für die gesunden. Die Unterschiede zwischen den gesunden und kranken Tieren sind infolgedessen eher zu niedrig als zu hoch ausgefallen.

Aus Tabelle I geht hervor, daß das Gewicht der *ungetrockneten* Tibien bei den gesunden und kranken Tieren nahezu gleich groß war (ausgenommen bei C 38 und C 39).

Der Gehalt an *Trockensubstanz* war bei den Skorbuttieren jedoch absolut und relativ niedriger. Die Tibien dieser Tiere enthielten nämlich durchschnittlich 45,8 %, die der Kontrolltiere 56,2 % Trockensubstanz.

Ebenfalls war der *Aschegehalt* niedriger; dieser betrug nämlich durchschnittlich 24,3 % in den Knochen der kranken Tiere und 26,9 % in denen der gesunden; der Unterschied war also geringer als bei der Trockensubstanz. Daraus geht hervor, daß nicht nur Asche, sondern auch organische Substanz verloren gegangen ist; die Zahlen für die organische Substanz waren 21,5 bzw. 29,3 %. Der Verlust an organischen Bestandteilen war somit größer als der Verlust an anorganischen Stoffen. Infolgedessen war die Prozentzahl für den Aschegehalt der Trockensubstanz bei den kranken Tieren größer als bei den gesunden (53,2 bzw. 47,9 %).

Fragt man sich, welchem Bestandteile des Grases dieser günstige Einfluß zuzuschreiben ist, so kommt in erster Linie das Vitamin C in Betracht, denn man nimmt allgemein an, daß das Grundfutter genügende Mengen der übrigen lebenswichtigen Bestandteile (für Meerschweinchen) enthält; tatsächlich sind die Kontrolltiere an

Tabelle I.

Nr.	Gewicht der Tiere in g		Nahrung		Gewicht mg	Trockensubstanz		Asche			CaO			P_2O_5			$\frac{CaO}{P_2O_5}$
	zu Beginn des Versuchs	bei Beendigung des Versuchs				mg	%	mg	in % vom Totalgewicht	in % der Trockensubstanz	mg	in % der Trockensubstanz	in % der Asche	mg	in % der Trockensubstanz	in % der Asche	
C 31	255	230	kein Gras	Tibia I	619	295	47,7	149	24,1	50,5	77,6	26,3	52,1	62,3	21,1	41,8	1,25
				Tibia II	631	317	50,2	161	25,5	50,8	84,4	26,6	52,4	67,3	21,2	41,8	1,25
				Durchschnitt:	*625*	*306*	*49,0*	*155*	*24,8*	*50,7*	*81,0*	*26,5*	*52,3*	*64,8*	*21,2*	*41,8*	*1,25*
C 30	246	259	2 g Gras	Tibia I	600	329	54,8	161	26,8	48,9	86,4	26,3	53,7	67,3	20,5	41,8	1,28
				Tibia II	610	328	53,8	160	26,2	48,8	86,8	26,5	54,3	67,3	20,5	42,1	1,29
				Durchschnitt:	*605*	*329*	*54,3*	*160,5*	*26,5*	*48,9*	*86,6*	*26,4*	*54,0*	*67,3*	*20,5*	*42,0*	*1,29*
C 32	254	237	kein Gras	Tibia I	591	288	48,7	144,7	24,5	50,2	76,4	26,5	52,8	62,4	21,7	43,1	1,22
				Tibia II	655	289	44,1	147,8	22,6	51,1	77,6	26,9	52,5	62,6	21,7	42,4	1,24
				Durchschnitt:	*623*	*289*	*46,4*	*146,3*	*23,6*	*50,7*	*77,0*	*26,7*	*52,7*	*62,5*	*21,7*	*42,8*	*1,23*
C 33	236	269	2 g Gras	Tibia I	605	334	55,2	158,2	26,1	47,4	84,4	25,3	53,3	68,2	20,4	43,1	1,24
				Tibia II	623	345	55,4	161,6	25,9	46,8	84,0	24,3	52,0	69,2	20,1	42,8	1,21
				Durchschnitt:	*614*	*340*	*55,3*	*159,9*	*26,0*	*47,1*	*84,2*	*24,8*	*52,7*	*68,7*	*20,3*	*43,0*	*1,23*
C 36	333	248	kein Gras	Tibia I	778	333	42,8	192,0	24,7	57,7	101,4	30,5	52,8	80,6	24,2	42,0	1,26
				Tibia II	790	353	44,7	197,9	25,1	56,1	105,8	30,0	53,5	82,4	23,3	41,6	1,28
				Durchschnitt:	*784*	*343*	*43,8*	*195,0*	*24,9*	*56,9*	*103,6*	*30,3*	*53,2*	*81,5*	*23,8*	*41,8*	*1,27*
C 37	322	348	1 g Gras	Tibia I	810	468	57,8	231,0	28,5	49,4	120,0	25,6	51,9	96,6	20,6	41,8	1,24
				Tibia II	799	464	58,1	229,4	28,7	49,4	120,0	25,9	52,3	96,2	20,7	41,9	1,25
				Durchschnitt:	*805*	*466*	*58,0*	*230,2*	*28,6*	*49,4*	*120,0*	*25,8*	*52,1*	*96,4*	*20,7*	*41,9*	*1,25*
C 38	226	193	kein Gras	Tibia I	572	248	43,4	131,9	23,1	53,2	70,4	28,4	53,4	57,1	23,0	43,3	1,23
				Tibia II	477	212	44,4	117,6	24,7	55,5	64,4	30,4	54,7	51,7	24,4	44,0	1,25
				Durchschnitt:	*525*	*230*	*43,9*	*124,8*	*23,9*	*54,4*	*67,4*	*29,4*	*54,1*	*54,4*	*23,7*	*43,7*	*1,24*
C 39	230	264	1 g Gras	Tibia I	644	360	55,9	164,0	25,5	45,6	88,2	24,5	53,8	70,2	19,5	42,8	1,26
				Tibia II	609	356	58,5	164,8	27,1	46,3	88,4	24,8	53,6	70,7	19,9	42,9	1,25
				Durchschnitt:	*627*	*358*	*57,2*	*164,4*	*26,3*	*46,0*	*88,3*	*24,7*	*53,7*	*70,5*	*19,7*	*42,9*	*1,26*
Durchschnitt der Tiere ohne Gras.																	
	267	**227**	kein Gas		**639**	**292**	**45,8**	**155,3**	**24,8**	**53,2**	**82,8**	**28,2**	**53,1**	**65,8**	**22,6**	**42,5**	**1,25**
Durchschnitt der Tiere mit Gras.																	
	259	**285**	1 od. 2 g Gras		**663**	**373**	**56,2**	**178,8**	**26,9**	**47,9**	**94,8**	**25,4**	**53,1**	**75,7**	**20,8**	**42,5**	**1,25**

Skorbut gestorben. Das Gras enthält jedoch noch ein anderes Vitamin, das für den Kalkstoffwechsel von Bedeutung ist, nämlich das Vitamin D. Daher haben wir noch einige Versuche angestellt, bei denen zum Grundfutter noch 0,5 ccm Lebertran pro Tag und pro Tier zugesetzt wurde. Wie wir erwarteten, war das Versuchsresultat fast genau das gleiche wie vorher (Tabelle II).

Tabelle II.

Nr.	Gewicht der Tiere in g		Nahrung		Gewicht mg	Trockensubstanz		Asche		
	zu Beginn des Versuchs	bei Beendigung des Versuchs				mg	%	mg	in % vom Totalgewicht	in % der Trockensubstanz
C 66	286	203	kein Gras	Tibia I	623	285,6	45,8	152,6	24,5	53,4
				Tibia II	589	270,3	45,9	141,4	24,0	52,3
				Durchschnitt:	*606*	*278,0*	*45,9*	*147,0*	*24,3*	*52,9*
C 67	263	258	1 g Gras	Tibia I	638	328,4	51,5	166,2	26,1	50,6
				Tibia II	615	309,5	50,3	155,0	25,2	50,1
				Durchschnitt:	*627*	*319,0*	*50,9*	*160,6*	*25,7*	*50,4*
C 69	280	196	kein Gras	Tibia I	590	255,4	43,3	140,6	23,8	55,1
				Tibia II	592	276,7	46,7	148,8	25,1	53,8
				Durchschnitt:	*591*	*266,1*	*45,0*	*144,7*	*24,5*	*54,5*
C 68	286	297	1 g Gras	Tibia I	671	364,1	54,3	181,2	27,0	49,8
				Tibia II	675	365,2	54,1	184,6	27,3	50,5
				Durchschnitt:	*673*	*364,7*	*54,2*	*182,9*	*27,2*	*50,2*
C 71	278	223	kein Gras	Tibia I	597	289,0	48,4	149,7	25,1	51,8
				Tibia II	564	246,6	43,7	131,7	23,4	53,4
				Durchschnitt:	*581*	*267,8*	*46,1*	*140,7*	*24,3*	*52,6*
C 70	288	315	2 g Gras	Tibia I	625	376,7	60,3	179,5	28,7	47,7
				Tibia II	672	391,2	58,2	189,8	28,2	48,5
				Durchschnitt:	*648*	*384,0*	*59,3*	*184,7*	*28,5*	*48,1*
Durchschnitt der Tiere ohne Gras.										
	281	**207**	kein Gras		**593**	**270,6**	**45,6**	**144,1**	**24,8**	**53,3**
Durchschnitt der Tiere mit Gras.										
	279	**290**	1 od. 2 g Gras		**649**	**355,9**	**54,8**	**176,1**	**27,1**	**49,5**

Betrug der Gehalt an Trockensubstanz in den Knochen der kranken und gesunden Tiere in den ersten Versuchen 45,8 bzw. 56,2 %, so fanden wir bei den Lebertranversuchen durchschnittlich 45,6 und 54,8 %. Für den Aschegehalt der ungetrockneten Knochen ergaben sich früher 24,3 und 26,9 %, in der zweiten Reihe 24,3 und 27,1 %. Auch in der letzten Versuchsreihe ist also mehr organische als anorganische Substanz verschwunden, so daß der Aschegehalt der Trockensubstanz in den

Tibien der kranken Tiere höher als in denen der gesunden war. In der ersten Versuchsreihe fanden wir nämlich 53,2 bzw. 47,9 %, in der zweiten Reihe 53,3 bzw. 49,5 %.

In der ersten Versuchsreihe (Tabelle I) bestimmten wir auch den Gehalt der Asche an CaO und P_2O_5. Sowohl bei den gesunden als auch bei den kranken Tieren fanden wir durchschnittlich 95,6 % CaO + P_2O_5. Das Verhältnis CaO/P_2O_5 hatte sich nicht geändert; in beiden Fällen fanden wir durchschnittlich 53,1 % CaO und 42,5 % P_2O_5. Der Gehalt an MgO wurde nicht bestimmt, weil die Methodik der Mikro-Magnesiumbestimmung in Flüssigkeiten mit relativ viel CaO zu der Zeit, als wir diese Versuche durchführten, noch nicht genügend ausgearbeitet war. Auf Grund unserer Zahlen muß es jedoch als unwahrscheinlich betrachtet werden, daß der MgO-Gehalt in den Knochen der kranken Tiere stark erhöht war, wie *Howe*[1] und *Toverud*[2] für die Zähne glauben gezeigt zu haben. Eine geringe Zunahme halten wir jedoch für recht gut möglich und glauben diese ab und zu tatsächlich bei den Versuchen beobachtet zu haben, die wir zur Bestimmung des MgO-Gehalts ausgeführt haben.

Die chemische Untersuchung hat also ergeben, daß bei akutem Skorbut *der Gehalt der Schienbeine an Trockensubstanz, Asche, Kalk und Phosphor kleiner als bei gesunden Tieren ist; das Verhältnis CaO/P_2O_5 hat sich nicht geändert.*

Es muß jedoch gesagt werden, daß die Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung geringer sind, als wir auf Grund der großen Zerbrechlichkeit der Knochen erwarteten. Bei Rachitis ist die Abnahme viel bedeutender.

Eine mehr oder weniger befriedigende Erklärung für den Unterschied von Rachitis bietet die mikroskopische Untersuchung. Bei Rachitis wird wohl neues Knochengewebe gebildet, aber die Imprägnation mit Kalksalzen ist ungenügend, so daß das Mikroskop unverkalktes Knochengewebe zeigt. Bei Skorbut ist das Wachstum der Knorpelzellen und die Neubildung von Knochengewebe gehemmt, während die auch normalerweise stattfindende Resorption fortschreitet. Wie aus der mikroskopischen und chemischen Untersuchung hervorgeht, ist die Imprägnation mit Kalksalzen jedoch normal, vielleicht stärker als normal. Auch die klumpigen Knochenmassen in der Nähe der Epiphysenlinien bewirken, daß die Kalkverarmung eine geringere als bei Rachitis ist. Diese Knochenmassen sind jedoch für die Festigkeit von

[1] *Howe*, Journ. Amer. med. Assoc. 79, 1567, 1922.
[2] *Toverud*, l. c.



wenig Bedeutung. Die Sprödigkeit der Knochen wird also weniger durch die Kalk- und Phosphorverarmung als durch die Umwandlung der mikroskopischen Struktur verursacht.

Wie es also scheint, ist die Kalk- und Phosphorverarmung für die Entstehung der rachitischen Knochenveränderungen von primärer Bedeutung; bei den skorbutischen Knochen ist die Kalk- und Phosphorverarmung sekundär. Die Untersuchungen von *Heubner*[1], *Lipschütz*[2], *Schmorl*[3] und *Masslow*[4] sollen bei diesem Schlusse jedoch zu einiger Vorsicht mahnen, weil diese Forscher bei Hunden durch phosphorarme Nahrung eine Krankheit beobachteten, welche eine große Übereinstimmung mit Skorbut aufwies.

Zusammenfassung.

Das Vitamin C besitzt bei Meerschweinchen große Bedeutung für den Knochenapparat. Außer den bekannten makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen konnten wir bei Vitamin C-frei gefütterten Tieren mittels chemischer Analysen in den Knochen (Tibiae) etwa 10% weniger an Asche, Calcium und Phosphor ermitteln als bei Paralleltieren, welche praktisch dieselbe Menge Grundfutter (Heu, Hafer und autoklavisierte Milch) und überdies täglich noch 1 bis 2 g frisches Gras erhalten hatten. Der Trockensubstanzgehalt war um etwa 19% niedriger. Das Verhältnis CaO/P_2O_5 war unverändert. Zu fast dem gleichen Ergebnis gelangten wir, als dem Grundfutter täglich noch 0,5 g Lebertran zugesetzt wurde.

Die Sprödigkeit der skorbutischen Knochen wird weniger durch die Kalk- und Phosphorverarmung als vielmehr durch die Umwandlung der mikroskopischen Struktur verursacht.

---

[1] *Heubner*, Münch. med. Wochenschr. 58, 2543, 1911.
[2] *Lipschütz*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 26, 210, 1910.
[3] *Schmorl*, ebendaselbst 73, 313, 1913.
[4] *Masslow*, diese Zeitschr. 64, 106, 1914.

Über die Verschiebung der Absorptionsstreifen organischer Farbstoffe, gelöst in verschiedenen Alkoholen bei konstanter und bei variierter Farbstoffkonzentration.

Von

Lilly Hirschler.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Königl. ungar. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 30. September 1927.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Die Erscheinung der theoretisch so wichtigen selektiven Lichtabsorption hat auch ein hervorragendes biochemisches Interesse, da ja die Absorptionsstreifen gefärbter Lösungen oft zu ihrem Nachweis herangezogen werden und auch differential-diagnostisch wichtig sind. Wenn aber, wie aus der *Kundt*schen Regel hervorgeht, die Lage eines Absorptionsstreifens auch am selben Farbstoff von der Art des Lösungsmittels, bzw. nach *Kalandek* auch von der Konzentration des Lösungsmittels abhängt, so ist es begreiflich, daß zur eindeutigen Charakterisierung eines Farbstoffes auch das Lösungsmittel und die Farbstoffkonzentration der Lösung angegeben werden muß.

In den Versuchen, über die nachstehend berichtet werden soll, wurde das Verhalten einer Reihe von Farbstoffen nach beiden Richtungen hin geprüft.

A. Versuchseinrichtung.

Als Lösungsmittel wurden, da sie auch am leichtesten zu beschaffen sind, die Alkohole Methyl-, Äthyl-, Propyl-, Isobutyl- und Isoamylalkohol verwendet, und konnten dementsprechend von Farbstoffen nur solche herangezogen werden, die sich in den genannten Alkoholen gut lösen und hinreichend scharf ablesbare Absorptionsstreifen im sichtbaren Spektrum haben. Als solche haben sich geeignet erwiesen: Alkaliblau, Capriblau, Chinolinblau, Cyanin, Diamantfuchsin, Diamantgrün, Eosin, Erythrosin, Gentianaviolett, Methylengrün, Methylviolett, Nachtblau, Nilblau, Patentblau, Phloxyn, Rhodamin B, Safranin, Säureviolett, Sudan III, Victoria-



blau und der von *Hári*[1] seinerzeit aus normalem Menschenharn durch Kondensation mit p-Dimethylaminobenzaldehyd kristallisiert darstellbare Farbstoff mit Skatoxyl als Paarling.

Bei der recht starken Lichtabsorption der meisten von mir untersuchten Farbstoffe konnten diese nur in starken Verdünnungen geprüft werden. Um nun einerseits nicht allzuviel von den Lösungsmitteln zu vergeuden, andererseits, um nicht allzu kleine Mengen der Farbstoffe abwägen zu müssen — was ja zu sehr bedeutenden Versuchsfehlern geführt hätte —, habe ich aus jedem Farbstoff zunächst eine recht konzentrierte Stammlösung, und erst aus dieser die geeigneten Verdünnungen bereitet. Bei der Verschiedenheit der Lichtabsorption der verschiedenen Farbstoffe war selbstredend auch die verwendete Konzentration eine verschiedene, jedoch innerhalb einer Versuchsreihe am selben Farbstoff in verschiedenen Lösungsmitteln die gleiche. Jedoch gerade um letzteres zu erreichen, mußte darauf Bedacht genommen werden, daß oft die Löslichkeit eines Farbstoffs in den verschiedenen Lösungsmitteln eine ungleiche war: gut in denen mit niederer, fortschreitend geringer in denen mit höherer C-Zahl. Demzufolge mußte oft auf eine Konzentration, die an den niederen für spektrometrische Zwecke als vorzüglich befunden war, verzichtet werden, da sie an den höheren nicht zu erreichen war.

Zu den Ablesungen diente ein *Zeiss*sches Spektrometer mit direkter Ablesung der Wellenlängen; die richtige Einstellung der Wellenlängentrommel wurde häufig mittels der Emissionslinie des Na kontrolliert.

Als Flüssigkeitsbehälter wurde eine 11 mm breite Küvette mit planparallelen Wänden benutzt, welch letztere mit dem Mittelstück nicht fest verbunden, sondern an dieses durch zwei federnde Metallspangen gedrückt wurden. Dadurch konnten die drei Teile der Küvette nach jedem Gebrauch leicht und vollständig gereinigt werden. Als Lichtquelle diente anfangs eine Nitralampe, später *Nernst*sches Licht.

Die Ablesungen erfolgten in einem Zimmer, dessen Temperatur nicht in dem Maße schwankte, daß hierdurch eine Beeinflussung der Ergebnisse hätte befürchtet werden müssen.

Eine Frage von prinzipieller Bedeutung war es, ob das Maximum je eines Absorptionsstreifens oder aber seine Ränder abzulesen seien, aus denen dann die Mitte berechnet werden konnte. Angesichts der Schwierigkeiten, ja sehr oft der Unmöglichkeit, die Stelle der maximalen Absorption festzustellen, habe ich durchweg nur die Mitte der Absorptionsstreifen aus ihren Rändern ermittelt.

Um die kaum zu vermeidenden Ablesungsfehler auf ein Minimum zu beschränken, wurden an jeder Lösung die Ränder der Absorptionsstreifen je sechsmal abgelesen; jedes einzelne der von mir als Versuchsergebnisse mitgeteilten Daten sind Mittelwerte von sechs Ablesungen.

Nicht zu vergessen sei der Versuchsfehler, hervorgerufen durch die Schwankungen in der Spannung des elektrischen Stromes der städtischen Leitung, durch den die Nitra- bzw. Nernstlampe gespeist wurde. Zu den Stunden, wo sich (in der Winterzeit) grobe, ohne weiteres bemerkbare Schwankungen zeigten, wurde überhaupt nicht abgelesen. Jedoch war die Netzspannung, daher auch die Intensität des Lichtes, auch sonst bald schwächer, bald stärker, was auch eine Änderung der Absorptionsstreifen zur Folge haben konnte, sei es bezüglich ihrer Breite, sei es — an asymmetrischen

[1] *P. Hári*, diese Zeitschr. **117**, 41, 1921; **168**, 453, 1926.

Streifen — bezüglich der Lage ihrer Mitte. Die auf diese Weise entstandenen Versuchsfehler waren aber nicht danach, daß sie die Versuchsergebnisse erheblich hätten beeinflussen können; immerhin konnten sie die Ursache der bemerkbaren, sonst kaum zu begründenden Schwankungen abgeben.

In den mit * bezeichneten Versuchen waren im Gegensatz zu den anderen derselben Reihe statt eines Streifens deren zwei zu beobachten, wobei aber namentlich ihre einander zugekehrten Ränder sehr verwaschen waren. Die Ergebnisse dieser Versuche wurden aus den voneinander abgekehrten Rändern der beiden Streifen berechnet, wie wenn es nur *einen* gegeben hätte.

Die Daten sämtlicher Versuche sind in der Generaltabelle am Ende des Textes enthalten; die aus der letzteren gezogenen Folgerungen sind durch Abbildungen erläutert.

B. Verschiebung der Absorptionsstreifen in homologen Lösungsmitteln bei identischer Farbstoffkonzentration.

Durch die *Kundt*sche[1] Regel wird folgendes ausgesprochen: „Hat ein farbloses Lösungsmittel ein beträchtlich größeres Brechungs- und Dispersionsvermögen als ein anderes, so liegen die Absorptionsstreifen einer in den Medien gelösten Substanz bei Anwendung des ersten Mittels dem roten Ende des Spektrums näher als bei Benutzung des zweiten.“ Während *Formánek*[2] von 910 diesbezüglich geprüften Farbstoffen die *Kundt*sche Regel nur an etwa der Hälfte derselben bestätigt fand und von *Walther*[3] das Umbelliferon, von *Adinolfi*[4] das Rhodamin B und das Uranin als Farbstoffe hervorgehoben werden, die jenem Gesetze nicht folgen, wurde sie von einer ganzen Reihe anderer Autoren: *Voigt*[5], *Sheppard*[6], *Havelock*[7] und *Kazay*[8] bestätigt und auf verschiedene Weise zu erklären versucht.

Auch in unserem Institut wurde über derlei Versuche berichtet und von *Szilárd*[9] die *Kundt*sche Regel am Hämatoporphyrin für normale Alkohole, für Äthylester, für Benzole bestätigt, daneben aber gefunden, daß z. B. je ein normaler und isomerer Alkohol mit verzweigter C-kette zwar angenähert dasselbe molekulare Brechungsvermögen haben, die Lage der vier Absorptionsstreifen des in ihnen

---

[1] *Kundt*, Wied. Ann. **4**, 34, 1878.

[2] *J. Formánek*, Untersuchung und Nachweis organischer Farbstoffe auf spektroskopischem Wege.

[3] *B. Walther*, Drude Ann. **17**, 369.

[4] *E. Adinolti*, Chem. Centralbl. **1923**, I, 194.

[5] *W. Voigt*, Drude Ann. **6**, 501.

[6] *E. Sheppard*, Chem. Centralbl. **1909**, II, 74 (Proc. Roy. Soc. London, Serie A, **82**, 256 bis 270).

[7] *T. H. Havelock*, ebendaselbst **1912**, I, 633 (Proc. Roy. Soc. London, Serie A, **86**, 16 bis 20).

[8] *E. v. Kazay*, ebendaselbst **1907**, II, 773 (Pharm. Post **40**, 531 bis 533).

[9] *A. Szilárd*, diese Zeitschr. **170**, 185, 1926.



gelösten Hämatoporphyrins aber *nicht* dieselbe ist und auch von Streifen zu Streifen in verschiedenem Maße und in verschiedenem Sinne verschoben sein kann. Dasselbe fand *Szilárd* auch bei Verwendung von normalen Alkoholen einerseits und von Äthylestern mit derselben C-Zahl andererseits, auch, wenn sie dasselbe molekulare Brechungsvermögen hatten.

Gleichfalls in unserem Institut wurde von *Kurelec*[1] das Verhalten der Absorptionsstreifen des Kaliumpermanganats und des Uranylacetats geprüft und gefunden, daß die Streifen des ersteren in verschiedenen organischen, homologen Lösungsmitteln mit ansteigender C-Zahl *rotwärts* und nur in starken organischen Säuren violettwärts verschoben werden. Genau entgegengesetzt verhielten sich die Absorptionsstreifen des Uranylacetats, indem sie unter den oben genannten Umständen meistens eine *violettwärts* und nur ausnahmsweise eine rotwärts gerichtete Verschiebung aufwiesen.

Aus meinen eigenen Versuchen geht eine Bestätigung der *Kundt*schen Regel hervor[2], indem es von den 21 untersuchten Farbstoffen

a) bloß einen, *Sudanrot III*, gab, an dem die Streifenmitte in den verschiedenen Lösungsmitteln keine oder bloß eine minimale *Verschiebung* aufwies;

b) bloß einen, die *Skatoxylverbindung*, an dem die Streifenmitte in jedem folgenden Lösungsmittel mit höherer C-Zahl *violettwärts* verschoben war;

c) drei Farbstoffe, *Diamantgrün*, *Methylengrün* und *Patentblau*, in denen die Streifenmitte beim Übergang von Methyl- zu Äthylalkohol; einen Farbstoff, *Methylengrün*, an dem sie auch beim Übergang von Propyl- zu Butylalkohol; und einen Farbstoff, *Chinolinblau*, an dem sie beim Übergang von Butyl- zum Amylalkohol *violettwärts* sich verschob.

In allen anderen weit zahlreicheren Fällen fand beim Übergang zum nächst höheren homologen Alkohol eine Verschiebung der Streifenmitten nach dem roten Spektralende statt.

Das Ausmaß dieser Verschiebung war ein verschiedenes je nach dem Farbstoff, je nach dem verglichenen Lösungsmittelpaar und auch je nach der verwendeten Farbstoffkonzentration. Sehr häufig betrug die Verschiebung nicht mehr als 1 bis 2 $\mu\mu$, am Alkaliblau allerdings bis zu 5, am Capriblau gar bis zu 11 $\mu\mu$ beim Übergang vom Methyl- zum Äthylalkohol.

---

[1] *V. Kurelec*, diese Zeitschr. **180**, 65, 1927.

[2] Da ich mangels der richtigen Homologen auch Isobutyl- und Isoamylalkohole verwenden mußte, sind meine Befunde mit den *Kundt*schen nicht streng vergleichbar.



Ohne mich etwa in die tieferen physikalischen Ursachen dieser Verschiebungen einzulassen, sei hier bloß auf folgende Zusammenhänge verwiesen. Da nämlich, wie eingangs erwähnt, nicht die Stellen der maximalen Absorption, sondern die Lage der Streifenränder abgelesen und aus dieser Lage die Streifenmitte berechnet wurde, ist es klar, daß letztere ausschließlich durch die Lage der Ränder bestimmt war. Dann liegen aber folgende Möglichkeiten vor:

a) *Eine Verschiebung der Streifenmitte findet überhaupt nicht statt,*

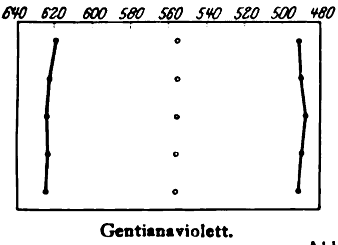
α) wenn die Streifenränder in den verschiedenen Lösungsmitteln ihre Lage nicht ändern, daher auch die Breite der Streifen unverändert bleibt;

β) wenn die Streifenbreite von Lösungsmittel zu Lösungsmittel wechselt, dabei aber der linke und der rechte Streifenrand gleich stark und in entgegengesetzter Richtung wegrücken;

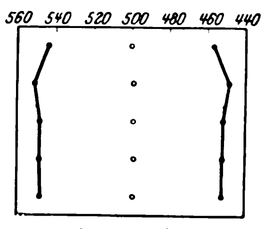
b) *Die Streifenmitte muß sich verschieben,*

γ) wenn der Streifen zwar von Lösungsmittel zu Lösungsmittel gleich breit bleibt, dabei jedoch seine Ränder gleich stark und in derselben Richtung wegrücken;

δ) wenn eine veränderliche Streifenbreite dadurch bewirkt wird, daß sich die beiden Ränder ungleich stark verschieben.



Gentianaviolett.



Sudanrot III.

Abb. 1.

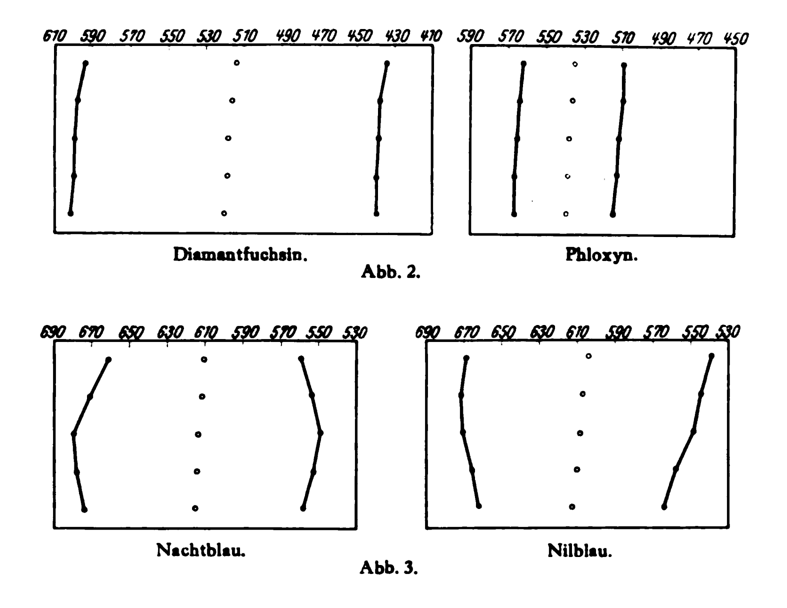
Suchen wir nun festzustellen, wie sich die von mir geprüften Farbstoffe diesbezüglich verhielten, so ergibt sich, daß

Fall α) in meinen Versuchen überhaupt nicht vorkam;

Fall β) traf am ausgesprochensten an der 0,02 %igen Lösung von *Gentianaviolett* und an der 0,009 %igen Lösung von *Sudanrot III* zu (Abb. 1[1]);

[1] Die Lage der Streifenränder ist hier wie in den übrigen Abbildungen durch Punkte, die der Streifenmitte durch Ringe angedeutet; die von oben nach unten einander folgenden Punkte bzw. Ringe gehören der Reihe nach dem Methyl-, Äthyl-, Propyl-, Isobutyl- und Isoamylalkohol an.

Fall γ) am ausgesprochensten an der 0,028%igen Lösung von *Diamantfuchsin* und an der 0,0067%igen Lösung von *Phloxyn* (Abb. 2);



Diamantfuchsin. Phloxyn.

Abb. 2.

Nachtblau. Nilblau.

Abb. 3.

Fall δ), der in meinen Versuchen weitaus am häufigsten vorkam, traf am charakteristischsten zu an der 0,0167%igen Lösung von *Nilblau* und an der 0,005%igen Lösung von *Nachtblau* (Abb. 3). In dieser Gruppe sind die Verhältnisse dadurch kompliziert, daß die Breite des Streifens in der Reihe der homologen Lösungsmittel zuweilen in hohem Maße auch zu-, dann wieder abnimmt. So betrug die

Breite des Streifens	In Methylalkohol $\mu\mu$	In Äthylalkohol $\mu\mu$	In Propylalkohol $\mu\mu$	In Butylalkohol $\mu\mu$	In Amylalkohol $\mu\mu$
An der 0,0067%igen Lsg. von Alkaliblau	50,2	57,9	52,6	41,2	19,8
An der 0,0025%igen Lsg. von Nachtblau	51,7	65,8	88,4	76,7	63,0

Doch muß bemerkt werden, daß sich das unter β), γ), und δ) geschilderte Verhalten an manchen Farbstoffen auf alle von mir untersuchten Konzentrationen bezieht; andere Farbstoffe hingegen in verschiedenen Konzentrationen ein verschiedenes, ja teilweise ein widersprechendes Verhalten zeigten. Alle diese Einzelheiten zu erörtern, würde zu keinen erwähnenswerten Ergebnissen führen; bezüglich gewisser Einzelheiten sei aber auf den nächsten Abschnitt verwiesen.

C. Verschiebung der Streifenmitte mit der geänderten Konzentration der Farbstofflösung.

Kalandek[1] sagt: „Bei der Vergrößerung der Konzentration in der Lösung ist eine unsymmetrische Erweiterung der Absorptionszone zu erwarten. Die Zone muß sich zum violetten Ende des Spektrums hin mehr erweitern, als zum roten hin". Meine diesbezüglichen Erfahrungen lauten wie folgt: Mit Ausnahme des *Skatoxyl*-Kondensationsproduktes (das allerdings nur in zwei verschiedenen Konzentrationen geprüft wurde) und des *Erythrosins*, deren Lösungen mit zunehmender Verdünnung eine *violettwärts* gerichtete Verschiebung der Streifenmitte in allen Lösungsmitteln aufwiesen, war *an allen übrigen Farbstoffen* (allerdings wieder mit Ausnahme einiger Verdünnungen vielleicht infolge von Versuchsfehlern) *mit zunehmender Verdünnung eine oft sehr bedeutende rotwärts gerichtete Verschiebung der Streifenmitte zu konstatieren*, was sich ja mit dem eingangs erwähnten *Kalandek*schen Befund deckt, wonach mit zunehmender Konzentration die Streifen sich violettwärts verschieben.

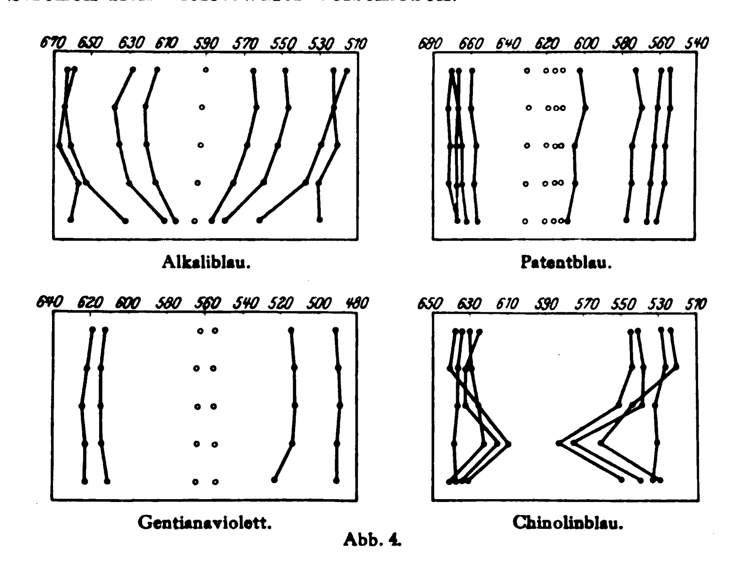


Abb. 4.

Der Grad der Verschiebung hing von dem fortschreitenden Verdünnungsgrad der Farbstofflösung ab; sie war kaum vorhanden an Alkaliblau, am deutlichsten am Patentblau, Gentianaviolett, Methylviolett und Safranin (Abb. 4[2]). Daneben gab es auch Farbstoffe, an

[1] *St. Kalandek*, Phys. Zeitschr., 9. Jahrg., Nr. 7, S. 128, 1908.

[2] Hiervon sind nur die drei erstgenannten Farbstoffe, und auch an diesen von allen in der Generaltabelle verzeichneten Konzentrationen nur jeweils die vier (bzw. zwei) stärksten abgebildet.

denen ganz unerwartete Unterschiede und Abweichungen mit der zunehmenden Verdünnung auftraten, und zwar sowohl bezüglich der Lage der Streifenmitte, wie auch bezüglich der Breite der Streifen. Dies war der Fall an Chinolinblau (Abb. 4), Rhodamin B, Säureviolett, Cyanin. Es ist zweifellos, daß sich in diesen Farbstoffen mit der Verdünnung zusammenhängende sekundäre Vorgänge, vielleicht physikalischer, vielleicht chemischer Natur abwickeln, die aber einer näheren Analyse bedürftig sind.

Wie kommt in allen diesen Fällen die Verschiebung der Streifenmitte zustande? Eine Prüfung der Daten der Generaltabelle, namentlich aber ein Blick auf Abb. 4 lehrt, daß es sich um eine *ungleiche Verschiebung* der *Streifenränder* handelt, indem mit jeder nächstfolgenden Verdünnung zwar beide Streifenränder gegeneinander rücken, jedoch der rechts gelegene Rand stärker rotwärts rückt, als der links gelegene violettwärts (nur beim *Skatoxylfarbstoff* und beim Erythrosin verhält es sich umgekehrt); daher handelt es sich also um eine *mit der fortschreitenden Verdünnung zunehmende asymmetrische Verschmälerung des Absorptionsstreifens*.

Wenn wir nun weiter fragen, warum diese Verschmälerung mit einer Verlagerung der Streifenmitte einhergeht, so ist es klar, daß dies nur *durch die Asymmetrie des Absorptionsstreifens verursacht sein kann*. *Kaidi*[1] sagt diesbezüglich:

„Ist ... der Absorptionsstreifen asymmetrisch ... so wird ... der Streifen in verdünnteren Lösungen ... schmäler, in konzentrierteren Lösungen breiter erscheinen, jedoch derart, daß der freie Rand der helleren Streifenhälfte in verdünnteren Lösungen stärker einwärts, in konzentrierteren stärker nach außen rückt, als der freie Rand der dunkleren Streifenhälfte, man daher die Streifenmitte ... in verdünnteren Lösungen nach dem exzentrisch gelegenen Absorptionsmaximum, in konzentrierten Lösungen in entgegengesetzter Richtung verlagert finden wird."

Dies wird von *Kaidi* an der Hand seiner Abb. 1 richtig dahin erklärt, daß die Lichtabsorption einer gewissen Intensität beiarf, damit sie vom Auge wahrgenommen werde. Stellt man die Lichtabsorption dreier verschieden konzentrierter Lösungen eines Farbstoffes mit asymmetrischen Absorptionsstreifen in Form von ebenso vielen übereinander gelagerten Kurven, die Grenze der eben noch vom Auge wahrnehmbaren Lichtabsorption aber durch eine der Abszisse parallele Gerade dar, so ergibt sich sofort, daß die Schnittpunkte der drei Kurven mit den Geraden, welche Schnittpunkte den Streifenrändern in den drei Lösungen entsprechen, am hellen Rande des asymmetrischen

[1] *L. Kaidi*, diese Zeitschr. **165**, 479, 1925.

Streifens weiter voneinander gelegen sein müssen, als am dunklen Teil, wo sich das Maximum der Lichtabsorption befindet, daher auch die aus den Rändern berechneten Streifenmitten sich in der verdünnten Lösung gegen den dunkleren Teil des Absorptionsstreifens verschieben müssen.

Da an weitaus den meisten der von mir untersuchten Farbstoffe die Streifenmitte mit zunehmender Verdünnung gegen Rot hin verschoben erschien, müssen die *Absorptionsstreifen jener Farbstoffe asymmetrisch gewesen sein,* und zwar in dem Sinne, daß *ihr Maximum sich näher zu ihrem rotwärts gelegenen Rande* befindet.

Die Schlüsse, die aus obigen Versuchsergebnissen gezogen werden können, lauten wie folgt:

a) Es wurden Farbstoffe in spärlicher Zahl gefunden, die, in Alkoholen von verschiedener C-Zahl geprüft, keine Verschiebung der Streifenmitte aufweisen; daneben aber eine weit größere Zahl, deren Streifen, der *Kundt*schen Regel gehorchend, mit aufsteigender C-Zahl des Lösungsmittels rotwärts rückten. Unter diesen Farbstoffen gibt es wieder einige, an denen der Absorptionsstreifen in allen Lösungsmitteln gleich breit ist, die Streifen aber und damit die Streifenmitten von Lösungsmittel zu Lösungsmittel weiter rotwärts rücken. *Dies sind die reinsten Fälle, und, wenn es versucht werden soll, nach den tieferen Ursachen der Verschiebungen zu fahnden, zu solchen Untersuchungen einzig geeignet.* Denn an der Mehrzahl der Farbstoffe, an denen eine Verschiebung der Streifenmitte gefunden wurde, findet mit dem Wechsel des Lösungsmittels auch eine asymmetrische Änderung der Breite des Streifens statt, wodurch die zu prüfenden Verhältnisse verdunkelt werden.

b) Die weitaus stärkere Verschiebung der Streifenmitte bei Variierung der Konzentration der Farbstofflösung läßt sich restlos durch eine asymmetrische Änderung der Streifenbreite bzw. durch eine Asymmetrie des Absorptionsstreifens selbst erklären.

Nach allem dem muß es sehr skeptisch aufgenommen werden, wenn man das Spektrum eines Farbstoffes in einem Lösungsmittel durch einen Absorptionsstreifen an einer Spektralstelle von ganz bestimmter Wellenlänge charakterisiert verzeichnet liest. Denn es gibt zwar sicherlich mehr als einen Farbstoff, deren Absorptionsstreifen sich mit Variierung der Konzentration nicht verschieben; bei der großen Mehrzahl der Farbstoffe dürfte aber diese Charakterisierung um so weniger zutreffen, je größer jene Verschiebung ist.

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung des Herrn Prof. *P. Hári* ausgeführt.



Generaltabelle.

Lage der Streifenränder und der Streifenmitten in verschiedenen Alkoholen und bei variierter Farbstoffkonzentration.

Name des Farbstoffs	Konz. der Lösung %	Methylalkohol Links μμ	Methylalkohol Rechts μμ	Methylalkohol Mitte μμ	Äthylalkohol Links μμ	Äthylalkohol Rechts μμ	Äthylalkohol Mitte μμ	Propylalkohol Links μμ	Propylalkohol Rechts μμ	Propylalkohol Mitte μμ	Isobutylalkohol Links μμ	Isobutylalkohol Rechts μμ	Isobutylalkohol Mitte μμ	Isoamylalkohol Links μμ	Isoamylalkohol Rechts μμ	Isoamylalkohol Mitte μμ
Alkaliblau	0,028	663,0	514.6	588,8	664,2	521,0	592,6	666,6	522,6	594,6	661,3	529,3	595,3	663,7	528,7	596,2
	0,028	662,0	523.2	592,6	664,1	522,5	593,3	667,4	520,0	593,7	656,6	531,4	594,0	660,4	530,8	595,6
	0,02	660,2	517.2	588,7	664,1	523,1	593,6	660,8	529.4	595,1	653,2	537,8	595,5	632,0	562,2	597,1
	0,01	629,3	549,0	589,2	637,9	547,2	592,6	635,2	552,4	593,8	630,5	559,7	595,1	611,7	581,3	596,5
	0,0067	616,1	565,9	591,0	622,0	564,1	593,1	621,4	568,8	595,1	616,5	575,3	595,9	606,8	587,0	596,9
Capriblau	0,0167	*666,6	585,7	626,2	682,6	589,6	635,1	681,0	593,8	637,4	682,2	591,4	636,8	679,6	594,0	636,8
	0,0167	*664,9	585,9	625,4	682,3	590,5	636,4	680,1	593,1	636,6	681,8	591,8	636,8	678,5	594,9	636,7
	0,0167	*664,5	586,1	625,3	682,4	589,6	636,0	680,4	592,4	636,4	681,4	592,4	636,9	678,8	595,2	637,0
	0,0067	674,2	625,3	649,8	675,4	636,1	655,8	678,9	634,0	656,5	677,7	635,7	656,7	681,9	632,3	657,1
	0,0045	669,5	639,0	654,3	673,1	644,2	658,7	675,7	642,9	659,3	673,4	646,5	660,0	675,7	644,4	660,1
Chinolinblau	0,025	635,6	528,2	581,9	636,9	527,9	582,4	636,5	533,7	585,1	634,6	536,0	585,3	638,5	535,1	586,8
	0,024	634,5	528,3	581,4	636,4	527,6	582,0	636,9	533,3	585,1	639,2	531,8	585,5	638,6	533,8	586,2
	0,024	635,0	528,2	581,6	636,5	527,5	582,0	637,2	532,6	584,9	629,4	541,8	585,6	638,5	532,3	585,4
	0,02	637,3	524,3	580,8	640,8	521,4	581,1	635,7	545,3	585,5	622,8	563,0	592,9	640,3	531,7	586,0
	0,02	637,2	524,2	580,7	641,0	520,8	580,9	626,4	544,8	585,6	623,4	562,8	593,1	639,4	532,4	585,9
	0,01	629,7	543,5	586,6	630,8	545,1	588,0	626,6	551,9	589,3	610,2	584,5	597,4	632,0	550,3	591,2
	0,0067	625,5	541,5	583,5	632,9	537,5	585,2	632,9	541,1	587,0	615,6	576,5	596,1	636,0	541,2	588,6
Cyanin	0,035	643,6	511,6	577,6	644,4	516,8	580,6	645,4	519,0	582,2	647,2	518,8	583,0	647,4	519,8	583,6
	0,035	642,6	511,2	577,7	644,4	515,2	579,8	645,7	517,5	581,6	646,5	520,3	583,4	644,5	524,1	584,3
	0,025	641,5	517,9	579,7	641,9	519,1	580,5	632,6	532,8	582,7	632,6	534,8	583,7	640,3	529,9	585,1
	0,01	635,4	543,2	589,3	635,8	543,8	589,8	632,7	547,8	590,3	624,3	561,3	592,8	633,4	556,2	594,8
	0,0042	616,6	572,8	594,7	617,7	573,6	595,7	620,3	572,8	596,6	623,3	573,9	598,6	625,2	572,9	599,1
Diamantfuchsin	0,028	592,4	434,8	513,6	594,6	438,4	516,5	597,3	438,9	518,1	598,6	438,6	518,6	599,6	441,6	520,6
	0,028	593,3	434,3	513,8	596,5	437,3	516,5	598,6	437,8	518,2	599,1	438,9	519,0	600,1	439,5	519,8
	0,025	584,5	444,7	514,6	597,6	434,4	516,0	600,2	435,0	517,6	601,6	435,4	518,5	601,5	436,5	519,0
	0,0033	576,0	476,0	526,0	578,0	475,7	526,9	579,4	479,6	529,5	580,0	481,2	530,6	579,6	482,6	531,1
	*0,0017	565,7	484,1	524,9	567,4	488,1	527,8	569,0	490,4	529,7	569,8	493,1	531,5	569,4	494,1	531,8

Generaltabelle (Fortsetzung).

Name des Farbstoffs	Konz. der Lösung	Methylalkohol			Äthylalkohol			Propylalkohol			Isobutylalkohol			Isoamylalkohol		
	%	Links μμ	Rechts μμ	Mitte μμ	Links μμ	Rechts μμ	Mitte μμ	Links μμ	Rechts μμ	Mitte μμ	Links μμ	Rechts μμ	Mitte μμ	Links μμ	Rechts μμ	Mitte μμ
Diamantgrün	0,032	677,6	546,4	612,0	676,3	551,3	613,8	683,9	541,3	612,6	679,1	549,9	614,5	678,9	551,5	615,2
	0,032	677,4	546,4	611,9	677,4	550,8	614,1	684,2	541,4	612,8	679,4	549,4	614,4	678,5	552,5	615,5
	0,03	677,2	545,0	611,1	676,6	550,6	613,6	683,1	542,1	612,6	680,1	546,9	613,5	679,3	550,9	615,1
	0,0067	662,2	569,0	615,6	664,6	568,3	616,5	664,0	568,2	616,1	664,0	574,0	619,0	666,4	571,7	619,1
	0,005	657,4	593,5	625,5	660,8	595,2	628,0	657,2	598,4	627,8	658,6	600,2	629,4	662,2	597,2	629,7
Eosin	0,02	551,6	458,0	504,8	556,2	467,0	511,6	556,7	468,5	512,6	557,2	468,6	512,9	556,5	471,9	514,2
	0,02	550,9	459,1	505,0	556,6	467,4	512,0	556,8	468,4	512,6	556,4	470,2	513,3	554,8	474,2	514,5
	0,02	551,2	459,6	505,4	556,4	466,4	511,4	557,4	468,6	513,0	557,4	470,0	513,7	554,4	474,4	514,4
	0,0084	545,2	475,1	510,2	550,1	477,7	513,9	551,4	479,5	515,5	552,4	481,1	516,8	550,4	484,8	517,6
	*0,0042	540,9	481,3	511,1	544,1	483,2	513,7	546,0	485,0	515,5	546,8	485,7	516,3	545,4	487,0	516,2
Erythrosin	0,025	561,6	469,8	515,7	562,5	475,7	519,1	564,7	494,3	529,5	564,4	494,6	529,5	564,9	494,3	529,6
	0,025	561,6	470,8	516,2	562,7	475,9	519,3	563,5	495,9	529,7	564,0	494,2	529,1	563,7	495,9	529,8
	0,0133	561,5	475,6	518,6	561,8	476,3	519,1	563,4	481,4	522,4	564,1	482,4	523,3	563,8	483,7	523,8
	*0,0067	543,4	483,1	513,3	543,7	483,8	513,8	545,1	485,4	515,9	545,6	485,8	515,7	545,2	486,7	516,0
Gentianaviolett	0,02	619,4	490,6	555,0	622,0	489,0	555,5	623,8	487,8	555,8	622,6	489,6	556,1	622,8	490,2	556,5
	0,02	618,7	491,4	555,1	621,4	489,6	555,5	623,5	488,5	556,0	622,2	490,4	556,3	622,4	491,1	556,8
	0,0067	612,3	514,5	563,4	613,8	513,5	563,7	614,7	513,1	563,9	614,0	514,8	564,4	611,2	521,7	566,5
	0,0029	599,3	569,7	584,5	600,9	569,3	585,1	612,8	569,8	586,3	601,6	571,3	586,5	597,5	575,5	586,5
Methylengrün	0,024	682,1	564,3	623,2	686,5	558,3	622,4	681,0	568,6	624,8	670,0	575,0	622,5	671,4	574,0	622,7
	0,024	681,6	565,2	623,4	686,2	559,0	622,6	680,7	569,5	625,1	669,8	575,0	622,4	670,4	575,0	622,7
	0,02	672,4	584,6	628,5	684,5	564,9	624,7	679,7	577,1	628,4	662,4	610,0	636,2	666,4	599,6	633,0
	0,02	672,5	584,5	628,5	685,9	562,5	624,2	677,5	580,7	629,1	652,0	599,0	625,5	665,0	590,4	627,7
	0,02	672,4	584,4	628,4	685,5	563,3	624,4	677,3	581,3	629,3	651,7	599,7	625,7	664,5	591,1	627,8
	0,005	656,0	611,4	633,7	653,1	613,8	633,5	649,5	617,6	633,6	646,7	617,6	632,2	648,9	618,3	633,6
Methylviolett	0,04	630,6	468,6	549,6	631,3	471,5	551,4	634,6	470,6	552,6	633,2	475,2	554,2	633,7	478,1	555,9
	0,04	629,7	469,7	549,7	632,6	471,4	552,0	633,6	472,6	553,1	631,5	478,5	555,0	632,9	477,9	555,4
	0,04	629,4	470,2	549,8	632,3	472,5	552,4	633,4	473,2	553,3	631,5	478,3	554,9	632,7	477,9	555,3

Generaltabelle (Fortsetzung).

Name des Farbstoffs	Konz. der Lösung %	Methylalkohol Links μμ	Methylalkohol Rechts μμ	Methylalkohol Mitte μμ	Äthylalkohol Links μμ	Äthylalkohol Rechts μμ	Äthylalkohol Mitte μμ	Propylalkohol Links μμ	Propylalkohol Rechts μμ	Propylalkohol Mitte μμ	Isobutylalkohol Links μμ	Isobutylalkohol Rechts μμ	Isobutylalkohol Mitte μμ	Isoamylalkohol Links μμ	Isoamylalkohol Rechts μμ	Isoamylalkohol Mitte μμ
Methylviolett	0,033	633,3	465,5	549,4	633,5	469,9	551,7	636,6	468,0	552,3	634,9	470,3	552,6	634,3	474,5	554,4
	0,033	633,7	465,5	549,6	633,4	469,8	551,6	636,4	468,0	552,2	634,8	470,8	552,8	633,6	475,6	554,6
	0,005	609,2	519,2	564,2	609,4	520,5	565,0	614,8	516,3	565,6	614,0	518,6	566,3	612,8	522,4	567,6
	0,0025	598,2	568,1	583,2	598,7	568,9	583,8	602,5	569,9	586,2	601,1	571,7	586,4	598,9	574,5	586,7
Nachtblau	0,02	675,7	533,9	604,8	677,6	538,4	608,6	681,1	540,3	610,7	686,2	535,4	610,8	686,7	541,5	614,1
	0,016	669,6	539,6	604,6	672,9	542,3	607,6	676,7	545,1	610,9	680,9	543,1	612,0	682,6	544,6	613,6
	0,011	662,5	547,3	604,9	663,6	553,8	608,7	663,7	557,9	610,8	664,6	560,2	612,4	672,1	556,1	614,1
	0,005	661,5	558,9	610,2	670,1	553,2	611,7	679,6	548,7	614,2	678,3	552,0	615,2	674,0	557,5	615,8
	0,0025	638,4	586,7	612,6	646,0	580,2	613,1	657,6	569,2	613,4	652,3	575,6	614,0	646,2	583,2	614,7
Nilblau	0,025	669,6	541,0	605,3	671,1	544,1	607,6	670,5	547,3	608,9	669,6	552,2	610,9	661,7	569,1	615,4
	0,025	670,0	540,4	605,2	672,2	543,8	608,0	670,4	548,2	609,3	663,5	559,7	611,6	659,4	572,6	616,0
	0,025	669,6	541,2	605,4	672,7	543,9	608,3	669,7	549,1	609,4	664,2	559,4	611,8	659,2	573,2	616,2
	0,0167	669,4	539,2	604,3	671,2	544,0	607,6	670,2	547,6	608,9	664,6	557,2	610,9	662,6	564,0	613,3
	0,0167	669,1	540,1	604,6	670,9	544,7	607,8	670,0	548,4	609,2	665,0	557,2	611,1	662,3	564,7	613,5
	0,01	663,8	576,5	620,2	664,6	576,8	620,7	659,9	583,8	621,9	656,7	587,9	622,3	654,8	591,0	622,9
	0,005	653,6	609,3	631,5	655,9	607,3	631,6	654,4	609,8	632,1	652,8	613,0	632,9	651,2	616,6	636,9
Patentblau	0,04	671,9	555,3	613,6	672,2	553,8	613,0	671,0	556,2	613,6	671,5	555,1	613,3	667,0	560,8	613,9
	0,04	673,6	553,4	613,5	672,6	552,8	612,7	672,2	555,8	614,0	671,7	553,9	612,8	669,6	559,4	614,5
	0,04	671,2	555,4	613,3	671,5	553,9	612,7	670,2	556,0	613,1	670,8	556,0	613,4	666,3	560,9	613,6
	0,04	670,7	556,3	613,5	671,4	554,4	612,9	670,0	556,6	613,3	670,4	556,4	613,4	666,0	561,6	613,8
	0,025	670,3	558,1	614,2	667,1	560,9	614,0	667,6	562,0	614,8	666,0	563,6	614,8	666,0	565,2	615,6
	0,025	669,8	559,0	614,4	666,8	561,4	614,1	667,4	561,8	614,6	665,8	563,8	614,8	665,7	564,9	615,3
	0,0133	667,1	571,7	619,4	666,8	568,7	617,8	665,4	574,2	619,8	665,5	574,4	620,0	663,6	576,7	620,2
	0,0067	659,4	602,8	631,1	659,7	599,6	629,7	657,6	604,7	631,2	658,2	604,5	631,4	655,8	608,3	632,1
Phloxyn	0,045	576,2	463,2	519,7	577,5	467,5	522,5	579,6	469,6	524,6	581,0	473,2	527,1	581,0	469,2	525,1
	0,044	576,4	463,4	519,9	577,5	467,9	522,7	579,8	470,0	524,9	580,5	471,5	526,0	580,6	473,4	527,0
	0,04	576,1	464,9	520,5	577,9	467,7	522,8	580,7	469,7	525,2	581,0	472,6	526,8	581,5	473,9	527,7
	0,0067	562,3	509,1	535,7	563,1	509,5	536,3	564,9	511,0	538,0	566,2	512,1	539,2	566,0	513,8	539,9
	*0,0045	558,6	521,9	540,3	558,7	522,8	540,8	560,2	523,8	542,0	561,0	524,6	542,8	560,7	525,8	543,3

Generaltabelle (Fortsetzung).

Name des Farbstoffs	Konz. der Lösung %	Methylalkohol			Äthylalkohol			Propylalkohol			Isobutylalkohol			Isoamylalkohol		
		Links μμ	Rechts μμ	Mitte μμ	Links μμ	Rechts μμ	Mitte μμ	Links μμ	Rechts μμ	Mitte μμ	Links μμ	Rechts μμ	Mitte μμ	Links μμ	Rechts μμ	Mitte μμ
Rhodamin B . . .	0,035	570,2	495,0	532,6	570,8	496,4	533,6	572,5	498,7	535,6	573,6	501,4	537,5	572,6	506,6	539,6
	0,035	570,6	492,8	531,7	571,2	493,8	532,5	572,9	499,1	536,0	574,3	500,1	537,2	571,8	505,8	538,8
	0,03	571,0	493,4	532,2	597,6	469,0	533,3	600,2	480,4	540,3	601,6	479,6	540,6	601,5	480,3	540,9
	0,0285	572,4	490,8	531,6	569,5	493,3	531,4	575,5	502,2	538,9	580,0	499,0	539,5	579,1	501,2	540,2
	*0,0143	565,6	497,7	531,7	567,2	500,3	533,8	572,2	506,3	539,3	574,8	509,1	542,0	574,1	508,8	541,5
Safranin	0,02	563,6	455,8	509,7	566,2	461,0	513,6	566,6	466,6	516,6	568,5	467,9	518,2	568,6	467,8	518,2
	0,02	562,7	458,5	510,6	566,7	461,1	513,9	566,7	467,1	516,9	569,0	466,4	517,7	571,2	464,6	517,9
	0,02	562,4	459,0	510,7	566,1	461,9	514,0	566,5	467,7	517,1	568,7	466,9	517,8	571,4	464,6	518,0
	0,005	556,9	484,5	520,7	559,1	484,7	521,9	560,9	485,7	523,3	565,6	483,2	524,4	563,4	487,9	525,7
	0,0025	544,9	526,9	535,9	548,9	523,4	536,2	550,8	523,7	537,3	556,0	519,3	537,7	552,1	524,2	538,2
Säureviolett	0,031	609,5	516,5	563,0	609,3	520,1	564,7	609,7	520,1	564,9	604,8	526,2	565,5	608,1	523,9	566,0
	0,031	609,4	517,0	563,2	609,7	519,5	564,6	610,0	519,8	564,9	605,1	525,3	565,2	607,9	523,7	565,8
	0,03	610,3	517,5	563,9	609,2	520,4	564,8	610,6	521,8	566,2	606,6	524,0	565,3	608,7	524,1	566,4
	0,022	607,8	520,4	564,1	607,8	522,8	565,3	604,9	529,1	567,0	594,6	575,6	585,1	594,3	577,3	585,8
	0,022	608,5	519,7	564,1	608,2	521,8	565,0	605,2	529,2	567,2	594,8	576,0	585,4	594,4	576,8	585,6
	*0,01	603,4	525,2	564,3	605,6	525,4	565,5	602,5	530,2	566,4	606,3	526,5	566,4	608,7	529,3	569,0
Skatoxylverbindung	0,0069	547,8	456,5	502,2	547,5	452,7	500,1	547,5	452,0	499,8	547,6	449,1	498,4	543,5	450,8	497,2
	0,006	541,2	457,4	499,3	541,2	453,7	497,5	541,4	452,3	496,9	542,5	450,2	496,4	536,6	453,2	494,9
Sudan III	0,009	544,1	457,9	500,6	550,9	448,7	499,8	547,9	451,7	499,8	548,1	451,5	499,8	547,7	451,9	499,8
	0,009	543,7	457,9	500,8	550,5	449,1	499,8	547,3	452,3	499,8	547,4	452,0	499,7	547,5	451,9	499,7
	0,0045	541,2	476,3	508,8	545,7	474,4	510,1	547,7	472,4	510,1	545,9	474,5	510,2	550,7	469,9	510,3
	0,0045	538,8	476,9	507,9	541,5	476,1	508,8	540,9	476,7	508,8	543,4	474,1	508,8	545,4	472,0	508,7
Victoriablau . . .	0,023	663,2	523,2	593,2	664,5	526,9	595,7	677,7	516,5	597,1	671,9	523,9	597,9	669,2	528,0	598,6
	0,023	662,2	524,2	593,2	663,8	527,8	595,8	676,7	518,1	597,4	672,1	522,9	597,5	668,0	528,0	598,0
	0,02	678,3	518,1	598,2	680,8	523,2	602,0	690,3	520,5	605,4	694,6	518,8	606,7	691,6	526,4	609,0
	0,02	677,8	519,0	598,4	680,6	524,0	602,3	689,7	521,7	605,7	694,3	518,7	606,5	692,4	526,0	609,2
	0,0084	647,0	541,1	594,1	648,4	516,4	597,4	654,6	543,2	598,1	659,7	540,5	600,1	659,3	544,1	601,7
	*0,0056	635,3	554,6	595,0	641,3	554,9	598,1	650,3	553,8	602,1	653,6	560,6	607,1	651,4	551,3	601,4

Über das Entstehen von Pigmenten in Pflanzen.

Von

Hans Schmalfuß und **Helene Barthmeyer.**

(Mitbearbeitet von **Hans Brandes**).

(Mitteilung aus dem Chemischen Staatsinstitut Hamburg, Universität.)

(Eingegangen am 30. September 1927.)

In einer früheren Arbeit[1] zeigten wir, daß die grünen Hülsen des Besenginsters (Sarothamnus scoparius Wimm.) dann dunkeln, wenn es dem Sauerstoff irgendwie möglich wird, in genügender Menge in die chromogenführenden Schichten einzudringen. Gewiß dringen fortlaufend in die grünen Hülsen geringe Mengen Sauerstoffs ein, die unter optimalen Umständen ausreichen würden, Melanin entstehen zu lassen[2]. Doch ist durch ungünstige Wasserstoffionenkonzentration, verbunden mit sauerstoffzehrenden Konkurrenzreaktionen, dafür gesorgt, daß normalerweise in den Hülsen vor der Reife kein Melanin entsteht. Sobald aber die Sauerstoffkonzentration so stark erhöht wird, daß die Konkurrenzreaktionen den Sauerstoff nicht mehr bewältigen können, dunkeln die Hülsen. Diesen sehr einfachen Komplex von Bedingungen wollen wir „Sarothamnus-Typus" nennen.

In der Natur ist dieser Typus sehr häufig. Man kann ihn leicht daran erkennen, daß der betreffende Organismenteil sauer reagiert und an einer geritzten Stelle unter dem Einfluß des Luftsauerstoffs in wenigen Minuten dunkelt. Als Beispiele seien die Fruchthülle der Roßkastanie (Aesculus Hippocastanum L.), das Fruchtfleisch des Apfels (Pirus Malus L.) und der Birne (Pirus communis L.), ferner verschiedene Pilze, wie der Hexenpilz (Boletus miniatoporus Secr.), genannt.

---

[1] Diese Zeitschr. **189**, 229 bis 232, 1927.

[2] *H. Schmalfuß*, B. **56**, 1855, 1923.

In anderen Fällen reicht Zufuhr von Sauerstoff im Ritzversuch nicht aus, Organismenteile vor der Zeit dunkeln zu lassen. Ein charakteristischer Typus dieser Art ist der Bedingungskomplex in den Hülsen der Saubohne (Vicia Faba L.), den wir „Vicia-Typus" nennen wollen. Setzt man leicht geritzte lebensfrische Hülsen in der „feuchten Kammer" dem Luftsauerstoff aus, so ist die geritzte Stelle nach 9 Tagen noch nicht geschwärzt[1,2], während Hülsen des Besenginsters unter gleichen Bedingungen bereits nach 5 Minuten an den geritzten Stellen dunkeln.

Wie wir feststellten, fehlt jedoch schon in den grünen Hülsen der Saubohne *qualitativ* nichts, was für das Dunkeln nötig ist. Es könnte also ein Unterschied in den *quantitativen* Verhältnissen dafür verantwortlich sein, daß die Hülsen der Saubohne schwieriger dunkeln als die des Besenginsters.

Im einzelnen hängt nun bei gegebenen qualitativen[3] Bedingungen das Dunkeln außer von der Konzentration des Sauerstoffs noch von den Konzentrationen des Chromogens, des Wassers, der Wasserstoffionen und des Fermentes ab. Mindestens eine dieser Konzentrationen müßte in der Hülse der Saubohne ungünstiger sein als in der Hülse des Besenginsters.

Es könnte z. B. die Konzentration freien Chromogens in den grünen Hülsen der Saubohne zu gering sein. Doch schon in jungen Hülsen ist freies Chromogen, nämlich 1-β-3, 4-Dioxyphenyl-α-aminopropionsäure[4], reichlich vorhanden. Das ergibt sich aus der Farbtiefe, die mit Eisenchlorid[5] entsteht.

Auch Wasser ist sicher in ausreichender Menge zugegen. Denn die grünen Hülsen der Saubohne sind wesentlich wasserreicher als die des Besenginsters. Ferner enthalten die Hülsen dann viel weniger Wasser, wenn sie schließlich während des Reifens spontan dunkeln.

---

[1] Bei Vicia Faba L., als einer Kulturpflanze, sind vielleicht auch Rassen vom Sarothamnus-Typus vorhanden. Wir werden danach suchen, weil sie für Fragen der Entwicklungschemie Bedeutung haben würden.

[2] Während des Liegens in der „feuchten Kammer" treten in den verletzten Zellen tiefgreifende Veränderungen ein, so daß die Ritzstellen später auch im Exsikkator nicht mehr dunkeln.

[3] Mögliche qualitative Unterschiede zwischen Saubohne und Besenginster sind für unsere Betrachtungen belanglos, da, wie wir weiter unten zeigen, auch die Hülsen der Saubohne nach 4 Minuten zu dunkeln beginnen, wenn man nur die hemmenden Faktoren ausschaltet.

[4] *Torquato Torquati*, Arch. di Farmacol. Sperim. **15**, 308 bis 312, 1913; *M. Guggenheim*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 88, 276 bis 284, 1913.

[5] *H. Schmalfuß*, *K. Spitzer* und *H. Brandes*, diese Zeitschr. **188**, 226, 1927.

Weiter könnte die Wasserstoffionenkonzentration dafür verantwortlich sein, daß die Hülsen der Saubohne weniger leicht dunkeln als die des Besenginsters. Doch liegt die Wasserstoffionenkonzentration der ausgewachsenen grünen Hülsen der Saubohne ([H˙] etwa $6 . 10^{-7}$) zwischen der Wasserstoffionenkonzentration der ausgewachsenen Hülsen des Besenginsters ([H˙] etwa 10^{-5}) und dem Optimum für das Entstehen von Melanin ([H˙] etwa 10^{-8}). Während des physiologischen Dunkelns wird die Wasserstoffionenkonzentration nicht günstiger, vielmehr steigt sie ein wenig an, und zwar in dem Maße, wie die Hülsen Wasser verlieren.

Die vorliegende Wasserstoffionenkonzentration schließt spontanes Dunkeln unter den gegebenen Bedingungen aus. Denn hierfür wäre ein alkalisches Medium nötig. Das Melanin muß daher, wie schon angedeutet, fermentativ entstehen. Wir wiesen das Ferment[1] mit Hilfe der Prüfstreifenmethode[2] und des Kochversuchs nach. Wie sich hierbei zeigte, reicht die Konzentration des vorhandenen Fermentes aus, Melanin entstehen zu lassen, obgleich die Konzentration wesentlich geringer ist als beim Besenginster[3].

Die verschiedenen Versuche zeigen also, daß die bisher untersuchten Faktoren, die qualitativ allein schon ausreichen, Melanin entstehen zu lassen, auch quantitativ genügen. Wir beobachten aber, daß die lebensfrischen Hülsen in der feuchten Kammer selbst geritzt nicht dunkeln. Es muß also auch etwas Hemmendes vorhanden sein. Nun sehen wir, daß die grünen Hülsen in der Natur bei der Reife dunkeln, wenn die Lebensprozesse in ihnen erlahmen. Dies legt den Schluß nahe, daß Prozesse, die an das Leben geknüpft sind, das Dunkeln verhindern. In der Tat dunkeln die Hülsen auch im Versuch, wie wir später sehen werden, wenn man die Lebensprozesse hemmt. Hierdurch könnte die Vorstellung geweckt werden, daß ausschließlich die Lebensprozesse

---

[1] Für die vorliegende Arbeit ist es belanglos, ob ein einzelnes Ferment oder eine Fermentgruppe das Melanin entstehen läßt.

[2] *H. Schmalfuß*, Naturw. **21**, 453 bis 457, 1927.

[3] Im Preßsaft der Hülsen des Besenginsters fehlen fixierende Stoffe. Darum läßt sich die Prüfstreifenmethode dort nicht anwenden. Wir verteilten deshalb die Fermentmenge eines Prüfstreifens in 1 ccm Chromogenlösung. Die Konzentration des Ferments ist dann im Vergleich zum Prüfstreifenversuch (*H. Schmalfuß*, diese Zeitschr. **178**, 224 bis 227, 1926) recht ungünstig. Trotzdem dunkelten m/100 3, 4-Dioxyphenylalaninlösung und m/450 4-Oxyphenylalaninlösung im Verlauf von etwa 4 Stunden.

Die Prüfstreifen aus grünen Hülsen der Saubohne hingegen dunkelten trotz der viel günstigeren Bedingungen nur in der leichter Melanin bildenden 3, 4-Dioxyphenylalaninlösung, und selbst hier erst im Verlauf von etwa 12 Stunden.



für das Grünbleiben der Hülsen verantwortlich gemacht werden könnten. Es sind jedoch, ähnlich wie beim Besenginster, noch andere Faktoren ungünstig. Erst dadurch, daß diese ungünstigen Faktoren zusammenwirken, wird die Geschwindigkeit des Dunkelns unter die Schwelle der Merklichkeit herabgedrückt. Daraus ergeben sich verschiedene Möglichkeiten, die Reaktionsgeschwindigkeit überschwellig werden zu lassen, indem bald dieser, bald jener Faktor neben anderen vorzugsweise verbessert wird. Das zeigen folgende Versuche an Hülsen der Saubohne.

1. *Betupfen der Hülsen mit Ammoniak.*

Betupft man Hülsen der Saubohne auf ihrer Innenseite[1] mit 25 %iger wässeriger Ammoniaklösung, so beginnen die betupften Stellen schon nach etwa 15 Minuten zu dunkeln. Wenn hier auch primär nur die Wasserstoffionenkonzentration günstiger gestaltet wird, so könnten doch außerdem z. B. noch die Durchlässigkeit des Gewebes für Sauerstoff erhöht und hemmende Begleitreaktionen gestört werden.

2. *Zerquetschen der Hülsen.*

Werden Hülsen zerkleinert, so dunkeln sie um so schneller, je mehr Zellen zerstört sind. Hülsen, die in einer Porzellanreibschale kräftig gestampft wurden, dunkelten schon im Verlauf von 35 Minuten deutlich. In diesem Versuch ist die Konzentration des Sauerstoffs stark erhöht, denn die Kutikula und viele Zellen sind zerstört, so daß der Sauerstoff ungehindert eindringen kann und nicht mehr durch Begleitreaktionen aufgezehrt wird. Gestaltet man auch noch die Wasserstoffionenkonzentration günstiger, indem man einen Tropfen gesättigter Natriumbicarbonatlösung zusetzt, so beginnen die benetzten Stellen schon nach 4 Minuten zu dunkeln.

3. *Austrocknen der Hülsen.*

Zerquetschte Hülsen dunkeln in der „feuchten Kammer" und im Exsikkator (neben Phosphorpentoxyd) praktisch gleich schnell. Zwar werden im Exsikkator die Konzentrationen von Ferment und Chromogen ein wenig günstiger, die Konzentrationen der Wasserstoffionen und des Wassers ein wenig ungünstiger. Doch wirken sich diese geringen Änderungen im Vergleich zu den geschilderten Folgen des Zerquetschens wegen der verhältnismäßig kurzen Reaktionszeit nicht merklich aus.

Anders liegen die Verhältnisse bei nicht zerquetschten Hülsen, die beim Liegen an mäßig feuchter Luft erst im Verlauf vieler Tage dunkeln.

[1] Die Kutikula der Außenseite ist für Ammoniak undurchlässig. Löst man aber mit Hilfe von Chloroform das Wachs fort, so wirkt das Ammoniak auch von der Außenseite her in gleicher Weise ein. Im optimalen Gebiet der Wasserstoffionenkonzentration, in der Randzone des Tropfens, entsteht das Melanin am schnellsten.



Hierbei verlieren die Hülsen viel Wasser. Z. B. verlor eine leere Hülse von 3,77 g Gewicht in 5 Tagen, bis zum Beginn des Dunkelns, 3,20 g Wasser. Nach 2 weiteren Tagen war die Hülse hart und lufttrocken geworden und hatte noch 0,15 g Wasser verloren. In weiteren 7 Tagen nahm das Gewicht nur noch um 0,02 g ab. Der Zellsaft wurde also bis zum Beginn des Dunkelns höchstens auf das 21fache konzentriert [(3,20 g + 0,15 g) : 0,15 g].

In früheren Arbeiten[1] zeigten wir, daß im vorliegenden Konzentrationsgebiet die Geschwindigkeit, mit der sich das Melanin bildet, nicht wesentlich beeinflußt wird, wenn die Konzentrationen des Chromogens und der Wasserstoffionen etwa auf das 21fache ansteigen. Dagegen liegt die Konzentration des Fermentes im kritischen Gebiet, wo die Wirkung mit zunehmender Konzentration stark wächst. Das zeigt folgender Versuch:

Prüfstreifen aus grünen Hülsen werden bei etwa 20° in 15 Stunden in m/100 wässeriger 3, 4-Dioxyphenylalanin-Lösung nur grau und bleiben in gesättigter 4-Oxyphenylalanin-Lösung, die viel schwerer Melanin bildet, farblos. Prüfstreifen von solchen Hülsen, die bereits lange an der Luft lagen und nun unter Wasserverlust dunkelten, wurden unter sonst gleichen Umständen in Dioxyphenylalanin-Lösung tiefschwarz, in Oxyphenylalanin-Lösung grau.

Nun wissen wir, daß sich Melanin bildet, wenn die hemmenden Lebensprozesse erlahmen. Weiter wissen wir, daß eine gewisse Menge Wasser vorhanden sein muß, damit die hemmenden Lebensreaktionen statthaben können. Auch das Chromogen braucht Wasser, wenn auch viel weniger, um in Melanin überzugehen. Das Optimum und das Minimum der Konzentration des Wassers (für das Entstehen von Melanin) liegen hier daher sehr dicht beieinander, wie auch aus den Zahlen des vorletzten Versuchs hervorgeht.

In der „feuchten Kammer“ dauern die Lebensvorgänge am längsten, weil kein Mangel an Wasser auftreten kann, und die Konzentrationen der reagierenden Stoffe und damit ihre Reaktionsgeschwindigkeiten am kleinsten sind. Unter diesen Umständen begann eine lebensfrische Hülse erst nach etwa 16 Tagen an den Enden zu dunkeln.

Schneller als in der „feuchten Kammer“ muß die Hülse dunkeln, wenn sie langsam *Wasser abgibt.* Denn dann müssen die Lebensprozesse schneller erlahmen als in der „feuchten Kammer“. Daher bildet sich das Melanin früher und auch mit ein wenig größerer Geschwindigkeit,

[1] *H. Schmalfuß* und *H. Werner*, Zeitschr. f. induktive Abstammungs- und Vererbungslehre **41**, 327 bis 329, 350 bis 353, 1926; *Dieselben*, Fermentforschung **8**, 824 bis 826, 1925.



weil die Konzentration des Fermentes gewachsen ist. So dunkelte eine Hülse, die frei an der Luft lag, nach etwa 8 Tagen[1].

Trocknet man schließlich eine Hülse *schnell* aus, so bildet sich aus Mangel an Wasser und Zeit[2] kein Melanin. Das läßt sich z. B. erreichen, wenn man eine geöffnete leere Hülse in möglichst trockner Luft an einem Faden aufhängt.

Das Entstehen von Melanin ist nicht an das Leben geknüpft. Deshalb muß die ausgetrocknete, grün gebliebene tote Hülse dunkeln, wenn man sie in Wasser einweicht und dann an der Luft liegen läßt. Der Versuch bestätigt dies. Wartet man die Lufttrockenheit nicht ab, sondern weicht die Hülse schon ein, bevor sie hart wird und bevor die Lebensvorgänge aufgehört haben, so nimmt die Hülse Wasser auf und die Lebensvorgänge verlaufen weiter. Die Hülse dunkelt dann lange Zeit nicht.

Was für die ganze Hülse gilt, gilt, allerdings etwas eingeschränkt, auch für einzelne chromogenführende Zellpartien. Das hilft, das entgegengesetzte Verhalten der Hülsen des Besenginsters und der Saubohne im Ritzversuch zu erklären. Ritzstellen der relativ wasserarmen Hülsen des Besenginsters dunkeln in der „feuchten Kammer" in 5 Minuten, im Exsikkator dagegen gar nicht. Denn die geschädigten Zellen trocknen so schnell aus, daß die Zeit zum Dunkeln fehlt. Ritzstellen der lebensfrischen Hülsen der Saubohne hingegen verhalten sich umgekehrt. In der „feuchten Kammer" dunkeln die Ritzstellen selbst im Verlauf mehrerer Tage nicht, wie wir schon eingangs erwähnt haben. Im Exsikkator neben Phosphorpentoxyd dagegen dunkeln die Ritzstellen in wenigen Stunden. Auch beim Liegen an der Luft können die Ritzstellen unter günstigen Umständen dunkeln.

Beim *Besenginster* muß in der „*feuchten Kammer*" an den Ritzstellen Melanin entstehen, weil hier wegen der sonst günstigen Verhältnisse Sauerstoffzufuhr allein genügt. Bei der *Saubohne* dagegen reicht Sauerstoffzufuhr nicht aus, offenbar weil die unverletzten Nachbarzellen, solange reichlich Wasser vorhanden ist, weiter das Entstehen von Melanin verhindern[3,4]. Denn zerstört man das Gewebe durch

[1] Die Hülsen des Besenginsters dunkeln an freier Luft noch wesentlich schneller. Denn hier genügt schon die wachsende Durchlässigkeit der Kutikula für Sauerstoff, die Hülsen in kurzer Zeit dunkeln zu lassen.

[2] Im selben Sinne wirkt im letzten Stadium des Trocknens voraussichtlich auch die stark angestiegene Wasserstoffionenkonzentration.

[3] Diese Funktion der Nachbarzellen wird dadurch bestätigt, daß grüne Hülsen, die vorher bereits tagelang in der „feuchten Kammer" gehungert hatten, also keine rege Lebenstätigkeit mehr besaßen, auch in der feuchten Kammer an den Ritzstellen dunkelten.

[4] Der umgekehrte Vorgang, Übergreifen der Melaninbildung von Wundstellen auf die Nachbarzellen, kommt bei *gealterten* Hülsen vor.



Zerquetschen ganz, so bildet sich, wie wir sahen, auch in der „feuchten Kammer" Melanin, und zwar um so schneller, je vollständiger das Gewebe zerstört ist.

Beim *Besenginster* kann sich im Exsikkator kein Melanin bilden, weil die verletzten Zellen wegen ihres geringen Wassergehaltes zu schnell austrocknen. Bei der *Saubohne* dagegen ist der Wasserreichtum des Gewebes sehr groß. Daher ist noch lange Zeit hindurch genügend Wasser in den abgetöteten Zellen vorhanden, so daß Melanin entstehen kann in dem Maße, wie die Nachbarzellen infolge des Wasserverlustes aufhören zu hemmen. Auch die wachsende Fermentkonzentration begünstigt das Entstehen von Melanin.

4. *Behandeln der Hülsen mit Chloroform oder Äther.*

Werden Hülsen der Saubohne etwa 5 Minuten lang mit Chloroform oder Äther behandelt, so dunkeln die Hülsen, an die Luft gebracht, im Verlauf von etwa 1 Stunde[1]. Die genannten Flüssigkeiten wirken mehrsinnig. Vor allem wirken sie dadurch, daß sie die hemmenden Lebensprozesse lähmen. Außerdem lösen sie das Wachs der Kutikula. Dadurch wird dem Sauerstoff der Zutritt und dem Wasser das Verdunsten wesentlich erleichtert. Doch ist das Austrocknen hier unwesentlich, weil die Zeit bis zum Beginn des Dunkelns zu kurz ist. Daher dunkeln die Hülsen in der „feuchten Kammer" nicht langsamer als im Exsikkator. Übrigens nimmt die Fermentkonzentration nicht zu, wenn die Hülsen in der „feuchten Kammer" dunkeln[2]. Das läßt sich mit Hilfe der Prüfstreifenmethode[3] zeigen. Hieraus ergibt sich zugleich, daß die Wirkung des Fermentes beim Austrocknen nur deshalb zunimmt, weil Wasser verdunstet.

Wir wenden uns nun der Frage zu, warum die Hülsen der Saubohne in der Natur schließlich dunkeln. Hier spielen verschiedene Faktoren mit, vor allem das Aufhören der sauerstoffzehrenden Lebensprozesse, dann auch noch das Austrocknen mit seinen Folgeerscheinungen, wie Durchlässigerwerden der Kutikula und Anwachsen der Fermentkonzentration.

Gewiß erlahmen bei den Hülsen des Besenginsters ebenfalls die Lebensprozesse, da nach der Reife die Stoffzufuhr aufhört. Doch hat

[1] Die Geschwindigkeit ist zwar schon groß, sie wird aber von den Hülsen des Besenginsters noch um das Zwölffache übertroffen. Auch dieser Versuch zeigt also, wie viel ungünstiger der Bedingungskomplex in den Hülsen der Saubohne ist.

[2] Die Wasserstoffionenkonzentration stieg hier von $6 \cdot 10^{-7}$ auf $5 \cdot 10^{-6}$.

[3] Chloroform an sich beeinflußt die fermentative Bildung von Melanin nicht. *H. Schmalfuß*, Fermentforschung 8, 14 ff., 1924.



dies hier keine so ausschlaggebende Bedeutung wie bei der Saubohne, weil schon das Durchlässigerwerden der Kutikula allein ausreicht, die Hülsen in kurzer Zeit dunkeln zu lassen.

Wie wir gesehen haben, ist der Regulationsmechanismus für das Entstehen von Melanin ungewöhnlich fein. Die mehrfache Sicherung, daß in den lebensfrischen grünen Hülsen kein Melanin entsteht, weist auf besondere Zwecke hin. Hiermit ist die Ansicht von *A. Bach*[1], daß das Chromogen als Oxydationsvermittler beim Atmungsprozeß in reversibler Reaktion wirkt, sehr gut vereinbar. Sobald sich in irreversibler Reaktion Melanin gebildet haben würde, wäre das Chromogen gleichsam totgebrannt und als Oxydationsvermittler ausgeschaltet. Erlahmen aber physiologisch in der reifen Hülse die Lebensprozesse und damit die Atmung, so wird das leicht reduzierbare Oxydationsprodukt des Chromogens nicht mehr reduziert von Stoffen, die veratmet werden, sondern es wird selbst zu Melanin weiter verändert. Ähnliche Prozesse, die beim Absterben des Gewebes nicht unbedingt zu gefärbten Produkten führen müssen, dürften recht verbreitet sein.

Zusammenfassung.

1. Die Bedingungen für das Dunkeln der Fruchthülle der Roßkastanie, des Fleisches von Apfel und Birne und des Gewebes mancher Pilze stimmen mit denen der Hülsen vom Besenginster im Prinzip überein. Dieser Komplex von Bedingungen wird als Sarothamnus-Typus bezeichnet. Man kann ihn leicht daran erkennen, daß der betreffende Organismenteil sauer reagiert und an einer geritzten Stelle unter dem Einfluß des Luftsauerstoffs in der „feuchten Kammer“ in längstens 30 Minuten bei 20° dunkelt.

2. Dem Sarothamnus-Typus wird der Vicia-Typus gegenübergestellt. Dieser Komplex von Bedingungen unterscheidet sich vom Sarothamnus-Typus dadurch, daß noch ein weiterer Faktor für das Entstehen von Melanin ungünstig ist. Äußerlich ist der Vicia-Typus daran zu erkennen, daß der betreffende Organismenteil sauer reagiert, die geritzten Stellen in der „feuchten Kammer“ jedoch in 30 Minuten nicht dunkeln, wohl aber langsam im Exsikkator.

3. Im lebensfrischen Gewebe der Saubohnenhülse ist durch mehrfache Sicherung dafür gesorgt, daß kein Melanin entsteht. Denn das Chromogen dient nach *Bach* wahrscheinlich als „Atmungschromogen“. Das Entstehen von Melanin wird nur wenig beeinflußt, wenn die Konzentrationen von Sauerstoff, Chromogen und Wasserstoffionen in be-

[1] Literatur bei *A. Oparin*, diese Zeitschr. 182, 155 bis 179, 1927.



stimmten, aber weiten Grenzen schwanken, stark aber, wenn die Konzentration des Fermentes geändert wird. Besonders wirksam verhindern Begleitprozesse, die an das Leben geknüpft sind, daß vorzeitig Melanin entsteht.

4. Das Dunkeln der Saubohnenhülsen läßt sich auf mannigfache Weise vorzeitig erzwingen, so durch Behandeln mit Ammoniak, Chloroform, Äther, durch Zerquetschen und durch geeignetes Austrocknen. Die mehrsinnige Wirkung dieser Maßnahmen wird eingehend begründet.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft in Berlin, Herrn Dr. *E. Hille* in Ebstorf, Herrn Dr. *R. Pantke* in Hamburg und Herrn Förster *K. Knoll* in Lopau danken wir für die Förderung dieser Arbeit. Die Untersuchungen werden im Hinblick auf Dominanzwechsel und Entstehung von „Eigenschaften" in Organismen auch auf Insekten ausgedehnt.

Die Reduktion von Kupferoxydsalzen durch Traubenzucker in Abhängigkeit von der Konzentration des verwendeten Kupfersulfates. Cuprioxyd als Nebenprodukt bei diesem Reduktionsvorgang.

Von

Susanne Adler.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 1. Oktober 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

I.

Anläßlich ihrer Untersuchungen über einige Bedingungen der Reduktion von Kupferoxyd durch Traubenzucker, wobei neben der Konzentration der Zuckerlösung unter anderem auch die Kochzeit variiert wurde, fand *Lányi*[1], daß die Menge des Reduktionsproduktes bei verlängerter Kochzeit zwar zunimmt, jedoch in geringerem Grade, wenn es sich um größere Zuckerkonzentrationen (100 mg im *Bertrand*schen Versuche) handelt, als bei Verwendung von geringen Zuckerkonzentrationen (40 mg). Diese und ähnliche Untersuchungen sind aus dem Grunde von Wichtigkeit, weil auf diese Art bei den meisten Zuckerbestimmungsmethoden, die auf der Reduktion von Kupferoxydsalzen beruhen, oft schon eine geringfügige Änderung der vorgeschriebenen Kochzeit zu einer erheblichen Änderung in der Menge des Reduktionsproduktes, daher auch zu einem falschen Bilde von der zu bestimmenden Zuckerkonzentration führen muß. Es ist daher in hohem Grade wünschenswert, die Bedingungen, unter denen die auf diese Weise entstehenden Fehler am geringsten sind, zu ermitteln.

Daß die Menge des Reduktionsproduktes von der Zuckerkonzentration in dem Sinne abhängt, daß durch größere Zuckermengen verhältnismäßig weniger als durch kleinere reduziert wird, ist längst bekannt; seit *Lányi* ist auch die oben erwähnte komplizierte Ab-

---

[1] *E. Lányi*, diese Zeitschr. **180**, 85, 1927.



hängigkeit der Menge des Reduktionsproduktes von Zuckerkonzentration und Kochzeit besser beleuchtet; eine weitere Rolle kommt aber auch der Konzentration des verwendeten Kupfersulfates zu, richtiger der komplexen Verbindung des aus Kupfersulfat und Natronlauge entstandenen $Cu(OH)_2$ mit Seignettesalz.

In den Versuchen, die den letzterwähnten Zusammenhang zum Vorwurfe hatten und über die nachstehend berichtet werden soll, wurde die Reduktion nach dem allbekannten *Bertrand*schen Verfahren, allerdings unter Variierung der Versuchsbedingungen, deren Einfluß geprüft werden sollte, ausgeführt.

Um richtige Resultate zu erhalten, mußten natürlich alle Bedingungen, die sich auf die Reinheit der verwendeten Reagenzien (wiederholt umkristallisiertes $CuSO_4$, Traubenzucker pro analysi von *Kahlbaum*), auf gleichmäßiges Kochen in den zu vergleichenden Versuchen usw. beziehen, genau eingehalten werden. Auch war es erwünscht, die Richtigkeit meiner Versuchsmethodik daran zu erproben, ob es mir gelingt, die *Bertrand*schen Originalergebnisse zu reproduzieren. Wie aus nachstehender Tabelle I ersichtlich, war dies der Fall, denn im Mittelwert aller Versuche habe ich bloß um 0,6 % mehr Cu, als maximalen Unterschied aber + 1 % erhalten.

Tabelle I.

Zucker mg	Cu nach *Bertrand* mg	Cu in meinen Versuchen mg	Cu % mehr (+) bzw. weniger (—) erhalten
15	30,2	30,4	+ 0,7
20	40,1	40,5	+ 1,0
40	77,5	78,0	+ 0,6
80	146,1	146,3	+ 0,1
100	177,8	179,3	+ 0,8

Auf dieser Grundlage konnte ich zu den eigentlichen Versuchen übergehen.

a) Ich verwendete stets dieselbe Zuckermenge, 40 mg, jedoch statt der von *Bertrand* vorgeschriebenen 20 g $CuSO_4$ pro 500 ccm Lösung größere Mengen desselben. Dabei habe ich, wie die Vorschrift lautet, 3 Minuten lang im Sieden erhalten. Wie aus Tabelle II hervorgeht, wird im Falle zunehmender $CuSO_4$-Konzentration zunehmend mehr Kupfer, als bei Einhaltung der Originalvorschrift reduziert; denn laut *Bertrand* liefern 40 mg Traubenzucker 77,5 mg Cu (Tabelle I), also weit weniger als in meinen Versuchen. Gleichzeitig ist aber aus Tabelle II zu ersehen, daß diese Zunahme an Reduktionsprodukt ein Maximum, und zwar bei 50 g $CuSO_4$ hat, worauf das Reduktionsprodukt

Tabelle II.

Zucker mg	$CuSO_4$ in 500 ccm g	Kochzeit Min.	Cu mg
40	40	3	86,6
40	50	3	88,0
40	60	3	87,0
40	70	3	85,9
100	24	10	194,4
100	50	10	223,6
100	60	10	226,4
100	70	10	223,9

wieder abnimmt, wie dies schon *Quisumbing* und *Thomas*[1] in ihren Versuchen fanden.

Dasselbe war in einer mit 100 mg Traubenzucker ausgeführten Versuchsreihe der Fall, in der ich, um größere Ausschläge zu erhalten, statt der vorgeschriebenen Kochzeit von 3 Minuten eine solche von 10 Minuten verwendet habe, und deren Ergebnisse ebenfalls in Tabelle II zusammengestellt sind. Auch hier wurde (teilweise auch infolge der längeren Kochzeit) mit zunehmender $CuSO_4$-Konzentration mehr Kupfer reduziert, und auch hier fand sich ein Maximum dieses Anstieges, und zwar bei Anwendung von 60 g $CuSO_4$.

b) In einer weiteren Reihe von Versuchen habe ich die verwendete Zuckermenge, die Konzentration der Kupferlösung, sowie auch die Kochzeiten variiert; die Ergebnisse dieser Versuche sind in nachstehender Tabelle III zusammengestellt.

Tabelle III.

Kochzeit	Zucker 40 mg, $CuSO_4$ 40 g in 500 ccm		Zucker 40 mg, $CuSO_4$ 70 g in 500 ccm		Zucker 100 mg, $CuSO_4$ 24 g in 500 ccm		Zucker 120 mg, $CuSO_4$ 24 g in 500 ccm		Zucker 100 mg, $CuSO_4$ 70 g in 500 ccm	
	Cu		Cu		Cu		Cu		Cu	
Min.	gefunden mg	pro 10 mg Zucker mg	gefunden mg	pro 10 mg Zucker mg	gefunden mg	pro 10 mg Zucker mg	gefunden mg	pro 10 mg Zucker mg	gefunden mg	pro 10 mg Zucker mg
3	—	—	—	—	—	—	220,0	18,3	—	—
5	89,7	22,4	—	—	—	—	221,3	18,4	—	—
10	93,3	23,3	104,9	26,2	194,4	19,4	223,1	18,6	211,8	21,2
20	102,7	25,7	—	—	—	—	—	—	—	—
30	110,6	27,6	141,1	35,3	200,4	20,4	227,6	19,0	241,9	24,2
40	—	—	—	—	—	—	—	—	258,2	25,8
50	—	—	—	—	—	—	—	—	276,2	27,6
60	—	—	204,6	51,1	—	—	—	—	291,8	29,2

[1] *F. A. Quisumbing* und *A. W. Thomas*, Journ. Amer. Chem. Soc. **43**, 1503 bis 1526, 1921.

Noch besser als aus Tabelle III sind die Ergebnisse dieser lehrreichen Versuche aus nachfolgender Abbildung zu ersehen, in der die auf 10 mg Zucker bezogenen Mengen des Reduktionsproduktes als Ordinaten in einem Koordinatensystem aufgetragen sind, das auf der Abszissenachse die Kochzeit in Minuten aufgezeichnet enthält. Der Tabelle und der Abbildung ist mehreres zu entnehmen: zunächst die altbekannte Tatsache, daß durch 40 mg Zucker verhältnismäßig mehr Kupfer als durch 100 bzw. 120 mg reduziert wird; ferner die aus der Mitteilung von *Lányi* bekannte Tatsache, daß durch die Verlängerung der Kochzeit (von meinen Versuchen sind es die mit den Kochzeiten von 10 bis 30 Minuten, die in allen Reihen vorkommen, daher gut verglichen werden können) die Menge des Reduktionsproduktes bei den kleinen Zuckerkonzentrationen (40 mg) weit stärker zunimmt: von 26,2 auf 35,3 mg = 35 %, als bei den größeren Zuckerkonzentrationen (100 mg): von 21,2 auf 24,2 mg = 14 %. Endlich geht aus diesen Versuchen in Übereinstimmung mit den sub a) und b) erörterten Befunden hervor, daß bei verlängerter Kochzeit die Menge des Reduktionsproduktes bei variierter Kupferkonzentration um so größer ist, je mehr $CuSO_4$ statt der vorgeschriebenen 20 g genommen wird. So war die Menge des Reduktionsproduktes beim Vergleich der Versuche mit 10 und 30 Minuten langem Kochen

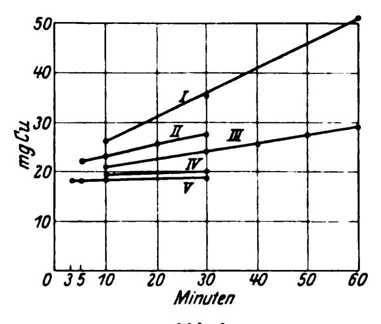


Abb. 1.
I: 40 mg Zucker, 70 g $CuSO_4$ (in 500 ccm der Lösung).
II: 40 mg Zucker, 40 g $CuSO_4$ (in 500 ccm der Lösung).
III: 100 mg Zucker, 70 g $CuSO_4$ (in 500 ccm der Lösung).
IV: 100 mg Zucker, 24 g $CuSO_4$ (in 500 ccm der Lösung).
V: 120 mg Zucker, 24 g $CuSO_4$ (in 500 ccm der Lösung).

bei	40 mg	Zucker	und	40 g $CuSO_4$	von	23,3	auf	27,6 mg	= 18 %
,,	40 ,,	,,	,,	70 g $CuSO_4$	,,	26,2	,,	35,3 ,,	= 35 %
,,	100 ,,	,,	,,	24 g $CuSO_4$	,,	19,4	,,	20,0 ,,	= 3 %
,,	100 ,,	,,	,,	70 g $CuSO_4$	,,	21,2	,,	24,2 ,,	= 14 %

angestiegen. Am wichtigsten scheint mir das letzterwähnte, an 100 mg Zucker erhaltene Ergebnis zu sein, darin bestehend, daß, *je geringer der absolute und auch im Verhältnis zur Zuckerkonzentration verwendete Kupferüberschuß ist, das Ergebnis durch Verlängerung der Kochzeit um so weniger beeinflußt wird.* Mithin ist auch zu erwarten, daß, wenn es gelingt, die zu verwendende Kupferkonzentration nach Maßgabe des vorhandenen Zuckers noch weiter herabzudrücken, die Verlängerung der Kochzeit überhaupt keinen Einfluß mehr auf die Menge des Reduktionsproduktes haben wird. Umgekehrt wird man aber auch schließen

müssen, daß, je weniger Zucker bei der Ausführung einer Reduktionsprobe mit vorgeschriebener Kupfersulfatmenge vorhanden ist, ein Abweichen von der vorgeschriebenen Kochzeit um so größere Fehler bedingen muß.

II.

Anläßlich obiger systematisch angestellter Versuche, durch Änderung der Konzentration der verwendeten Kupfersulfatlösung und der Kochdauer wenigstens teilweisen Einblick in die komplizierten Verhältnisse zu erhalten, die in den zur quantitativen Zuckerbestimmung gebräuchlichen Reduktionsproben obwalten, habe ich gelegentlich bemerkt, daß der rein rote Niederschlag von Cuprooxyd, den man sonst bei der *Bertrand*schen Methode erhält, von einer mehr oder minder großen Zahl von schwarzbraunen Körnchen durchsetzt ist. In der wohl begründeten Annahme, daß die Körnchen aus einer anderen Oxydationsstufe des Kupfers bestehen, habe ich sie zu isolieren versucht; dies gelang, allerdings in recht geringen Mengen, dadurch, daß ich den ganzen Niederschlag mit Ammoniak in der Wärme behandelt habe, wobei das Cu_2O in Lösung ging, von den dunkleren Körnchen aber die gröberen zurückblieben. In einer mit Schwefelsäure versetzten Lösung von Ferrisulfat waren die Körnchen löslich, und, da diese Lösung durch den ersten einfallenden Tropfen einer stark verdünnten Lösung von Kaliumpermanganat gerötet wurde, war es klar geworden, daß die dunklen Körnchen nicht aus Cu_2O bestehen können, sondern offenbar höher oxydiertes Kupfer enthalten, und ist es selbstverständlich, daß in erster Reihe an CuO, vielleicht gar in irgend einem organischen Komplex, gedacht werden mußte.

Letztere Möglichkeit konnte alsbald ausgeschlossen werden, indem durch die in einer Kaliröhre erhitzte Substanz vorgelegtes Barytwasser wohl ein wenig getrübt wurde, ohne jedoch, daß die Titration mehr als Spuren von CO_2 bzw. C ergeben hätte. Bei dieser Gelegenheit war sofort nach dem Beginn des Erhitzens an den kälteren Teilen der Röhre Kondenswasser in ansehnlichen Mengen zu sehen, obwohl die Substanz scharf getrocknet war.

Genaue Auskunft über die Zusammensetzung des fraglichen Körpers war von einer Bestimmung des Cu-Gehaltes zu erwarten, der auf zweierlei Weise vorgenommen werden konnte: durch *Elektrolyse* und durch *Reduktion im H-Strome.* Der Sicherheit halber habe ich die Analyse nach beiden Verfahren ausgeführt, sie aber zunächst wie folgt ausprobiert.

Die *Elektrolyse* wurde in einer Platinschale vorgenommen, die als Kathode diente, als Anode habe ich ein in die Lösung tauchendes Platinblech verwendet.



a) In 10 ccm einer Lösung von $CuSO_4$, die, jodometrisch bestimmt, 0,1267 g Cu enthielten, fand ich auf diese Weise 0,1266, 0,1264 und 0,1258 g.

b) CuO von *Merck* wurde in einem Ni-Tiegel ausgeglüht, abgewogene Mengen in 10 ccm 20%iger H_2SO_4 gelöst, die Lösung auf 40 ccm verdünnt und der Elektrolyse unterworfen. Statt des berechneten Cu-Gehalts von 79,9% fand ich

in 0,1212 g CuO 0,0962 g Cu = 79,4%
„ 0,1109 g CuO 0,0879 g Cu = 79,3%
„ 0,1056 g CuO 0,0840 g Cu = 79,6%
„ 0,0764 g CuO 0,0608 g Cu = 79,6%
„ 0,1061 g CuO 0,0844 g Cu = 79,6%
Mittelwert: 79,5%

c) Cu_2O habe ich in größeren Mengen dargestellt, indem ich in mehreren Ansätzen $CuSO_4$ in Gegenwart von Seignettesalz und Lauge durch je 100 mg Traubenzucker reduzieren ließ. Um eine größere Ausbeute zu erhalten, wurde die $CuSO_4$-Konzentration größer und die Kochzeit länger genommen, als der *Bertrand*schen Vorschrift entspricht, ohne jedoch, daß hierbei schwarze Körner gebildet wurden. Anstatt des berechneten Cu-Gehalts von 88,8% habe ich gefunden

in 0,1178 g Cu_2O 0,1033 g Cu = 87,7%
„ 0,1213 g Cu_2O 0,1063 g Cu = 87,6%
„ 0,0938 g Cu_2O 0,0825 g Cu = 87,9%
„ 0,0933 g Cu_2O 0,0822 g Cu = 88,1%
„ 0,0898 g Cu_2O 0,0794 g Cu = 88,4%
„ 0,0728 g Cu_2O 0,0645 g Cu = 88,6%
„ 0,0593 g Cu_2O 0,0514 g Cu = 86,7% (?)
„ 0,1106 g Cu_2O 0,0974 g Cu = 88,1%
„ 0,0877 g Cu_2O 0,0772 g Cu = 88,0%
Mittelwert: 87,9%

Reduktion im Wasserstoffstrom. Eine abgewogene Menge der Substanz wurde in ein Porzellanschiffchen eingebracht und in einer Kaliröhre im Verbrennungsofen geglüht, wobei durch eine 2%ige $KMnO_4$-Lösung gereinigter und durch konzentrierte H_2SO_4 getrockneter Strom von H über die Substanz strich.

a) *Merck*sches CuO ergab anstatt 79,9% Cu

0,1535 g CuO enthielt 0,1223 g Cu = 79,7%
0,1490 g CuO „ 0,1191 g Cu = 79,9%
0,1452 g CuO „ 0,1159 g Cu = 79,8%
Mittelwert: 79,8%

b) CuO, dargestellt durch Kochen einer Lösung von $CuSO_4$ mit verdünnter Lauge, Waschen, Trocknen und Glühen des Niederschlags, ergab anstatt 79,9% Cu:

0,1437 g CuO enthalten 0,1148 g Cu = 79,9%
0,0867 g CuO „ 0,0692 g Cu = 79,8%
0,1014 g CuO „ 0,0810 g Cu = 79,9%
0,1248 g CuO „ 0,0988 g Cu = 79,2%
0,1265 g CuO „ 0,1000 g Cu = 79,0%
0,1446 g CuO „ 0,1152 g Cu = 79,7%
Mittelwert: 79,6%

c) Cu_2O, nach der *Bertrand*schen Vorschrift dargestellt, lieferte im O-Strom *kein* Wasser und enthielt

in 0,0695 g Cu_2O 0,0608 g Cu = 87,5%
„ 0,1643 g Cu_2O 0,1456 g Cu = 88,6%
„ 0,1182 g Cu_2O 0,1041 g Cu = 88,1%
„ 0,1182 g Cu_2O 0,1043 g Cu = 88,2%
„ 0,1570 g Cu_2O 0,1394 g Cu = 88,8%
„ 0,1541 g Cu_2O 0,1363 g Cu = 88,5%

Mittelwert: 88,3%

Da sich auf diese Weise erwiesen hat, daß beide Verfahren recht zufriedenstellende Resultate geben, konnte ich an die Analyse der fraglichen Substanz gehen.

Wie weiter oben erwähnt, war es wohl möglich, die schwarze Substanz in geringen Mengen durch Weglösen des Cu_2O mit NH_3 zu isolieren; zur Cu-Bestimmung reichten sie aber durchaus nicht hin. Es mußte daher folgender Umweg eingeschlagen werden.

Kochte ich eine Lösung von 40 mg Zucker in Anwesenheit von Seignettesalz und Lauge mit einer Lösung von $CuSO_4$, die konzentrierter ist, als die vorgeschriebene, so war der Niederschlag, wenn die $CuSO_4$-Lösung:

	Bei 3 Min. langem Kochen	Bei 60 Min. langem Kochen
20 g in 500 ccm enthielt . . .	rein rot	rein rot
30 g „ 500 „ „ . . .	—	„ „
40 g „ 500 „ „ . . .	rein rot	—
50 g „ 500 „ „ . . .	„ „	rot mit wenig schwarz
60 g „ 500 „ „ . . .	„ „	—
70 g „ 500 „ „ . . .	rot mit wenig schwarz	—

Enthielt die Lösung die oben genannten Bestandteile, jedoch *keinen* Zucker, so war der Niederschlag, wenn die Kupferlösung in 500 ccm

	Bei 60 Min. langem Kochen
20 g $CuSO_4$ enthielt	rot, sehr wenig
30 g $CuSO_4$ „	rot, gering
40 g $CuSO_4$ „	rot, mit schwarz vermischt
50 g $CuSO_4$ „	braunschwarz, reichlich

Es ließ sich hieraus folgern, daß *in Abwesenheit von Zucker die überwiegende Menge des komplexen $Cu(OH)_2$ in CuO verwandelt wird*; *in Anwesenheit von Zucker jedoch ein angemessener Teil zu Cu_2O reduziert und nur darüber hinaus CuO gebildet wird.* Der Beweis, daß sich dies in der Tat so verhält, wird später zu erbringen sein (s. weiter unten).

Vor allem hatte ich demnach das in *Abwesenheit von Zucker* entstehende Produkt zu analysieren.

a) In einer ersten Reihe von Versuchen wurde die Substanz teils bei 95° C und dann im Exsikkator über Schwefelsäure, teils aber bei 120° C getrocknet und in 20%iger H_2SO_4 gelöst der Elektrolyse unterworfen.

Tabelle IV.

Bei 95° getrocknet			Bei 120° getrocknet		
Analysiert	Cu gefunden		Analysiert	Cu gefunden	
g	g	%	g	g	%
0,1032	0,0767	74,3	0,1237	0,0938	75,8
0,1266	0,0938	74,1	0,0799	0,0607	76,0
0,1239	0,0920	74,2			
0,1157	0,0867	74,9			

Die bei verschiedenen Temperaturen getrockneten Präparate ergaben allerdings etwas verschiedene Werte, doch weichen sie von dem berechneten Cu-Gehalt des CuO (von Cu_2O gar nicht zu reden) in so erheblichem Grade ab, daß dies durch etwaige Versuchsfehler nicht verursacht sein konnte. Ich habe schon weiter oben darauf verwiesen, daß auch die scharf getrocknete Substanz beim Glühen leicht und in nicht unerheblichen Mengen Wasser abgibt; auch ist in der Literatur eine ganze Reihe von Cuprioxyden mit ein bis mehreren Wassermolekülen angegeben.

b) Um diese Verhältnisse zu klären, wurde das zweiterwähnte Verfahren, doch in der folgenden etwas komplizierteren Form angewendet: Ich glühte eine abgewogene Menge der Substanz im O-Strome und bestimmte nun einerseits die Menge des in einer $CaCl_2$-Röhre aufgefangenen Wassers, weiterhin den Gewichtsverlust, den die Substanz hierbei erlitt, überführte dann den Rückstand durch Glühen im H-Strome in metallisches Cu. Aus diesen Bestimmungen mußte sich folgendes ergeben: Ist die Menge des Gewichtsverlustes gleich oder wenigstens nahezu gleich der des aufgefangenen Wassers, so mußte die Substanz aus hochoxydiertem Cu bestehen, konnte also kein Cu_2O enthalten haben; stimmte weiterhin der Cu-Gehalt, wenn er auf ursprüngliche Substanz minus Wasser bezogen wird, auf CuO, so hat die Substanz in der Tat nur aus CuO und Wasser bestanden. In nachstehender Tabelle V sind die Ergebnisse dieser Versuche zusammengestellt.

Aus diesen Versuchen geht erstens hervor, daß der auf die ursprüngliche Substanz bezogene Cu-Gehalt annähernd mit dem durch Elektrolyse erhaltenen übereinstimmt; weiterhin, daß aufgefangenes Wasser und Gewichtsverlust wohl nicht genau, jedoch so weit übereinstimmen, daß eine Sauerstoffaufnahme durch die im O-Strome geglühte Substanz nicht angenommen werden kann; endlich auch, daß der auf die wasserfreie Substanz bezogene Cu-Gehalt hinreichend gut auf CuO stimmt. *Also besteht der Niederschlag, den ich beim Kochen einer $CuOS_4$-Lösung in Anwesenheit von Lauge und Seignettesalz ohne Zucker erhielt, aus CuO,* das Wasser gebunden enthält.

Tabelle V.

Analysierte Substanz	Wasser aufgefangen		Gewichtsverlust		Cu gefunden	Cu, bezogen auf H_2O-haltige Substanz	Cu, bezogen auf H_2O-freie Substanz	Getrocknet bei
g	g	%	g	%	g	%	%	
0,1404	0,0072	5,1	0,0085	6,0	0,1047	74,6	79,4	Zimmertemperatur
0,1468	0,0075	5,1	0,0089	6,1	0,1095	74,6	79,4	
0,1390	0,0063	4,5	0,0083	6,0	0,1035	74,5	79,2	
0,1482	0,0081	5,5	0,0086	5,8	0,1112	75,0	79,6	
0,1525	0,0123	8,2	0,0083	5,4	0,1150	75,4	79,8	55—60° im Vakuum
0,1549	0,0090	5,8	0,0088	5,7	0,1165	75,2	79,7	
0,1512	0,0049	3,2	0,0050	3,3	0,1165	77,0	79,7	120° C
0,1485	0,0040	2,7	0,0050	3,4	0,1139	76,7	79,4	
0,1361	0,0044	3,2	0,0047	3,4	—	—	—	
0,1610	0,0052	3,2	0,0060	3,7	0,1225	76,1	79,0	
0,1413	0,0051	3,6	0,0050	3,5	0,1082	76,6	79,4	
0,1576	0,0049	3,1	0,0058	3,7	0,1195	75,8	78,7	
0,1481	0,0048	3,2	0,0051	3,4	0,1125	76,0	78,7	

Wenn dem aber so ist, so ergibt sich die weitere Frage, ob zwischen diesem CuO und dem, das einfach beim Kochen von Kupfersulfat mit verdünnter Lauge ohne Zucker, aber auch ohne Seignettesalz entsteht, (Tab. VI) ein Unterschied besteht oder nicht.

Tabelle VI.

Analysierte Substanz	Wasser aufgefangen		Gewichtsverlust		Cu gefunden	Cu, bezogen auf H_2O-haltige Substanz	Cu, bezogen auf H_2O-freie Substanz	Getrocknet bei
g	g	%	g	%	g	%	%	
0,1575	0,0072	4,6	0,0058	3,7	0,1202	76,3	79,2	Zimmertemperatur
0,1449	0,0055	3,8	0,0055	3,8	0,1106	76,3	79,3	
0,1234	0,0031	2,5	0,0030	2,4	0,0956	77,5	79,4	120° C
0,1484	0,0035	2,4	0,0035	2,4	0,1146	77,2	79,1	

Zwischen diesem und dem obigen Ergebnis besteht nur insofern ein Unterschied, als hier die Menge des beim Glühen entweichenden Wassers mit dem Gewichtsverlust in den meisten Versuchen sehr gut übereinstimmt; *die Substanz hat sich auch hier als* ein mit dem obigen identisches *wasserhaltiges CuO erwiesen.*

Auf S. 437 habe ich angenommen, daß die dunklen Körner, die sich bei Anwesenheit von Zucker infolge der verlängerten Kochzeit und der größeren Konzentration des verwendeten Kupfersulfates dem gewöhnlichen roten Cu_2O beimischen, aus demselben CuO bestehen, das sich beim längeren Kochen des Seignettesalz-Lauge-Kupfer-

salz-Gemisches in Abwesenheit von Zucker in großen Mengen bildet. Von der Richtigkeit dieser Annahme konnte ich mich auf Grund der voranstehenden Versuchsergebnisse und des folgenden Gedankenganges überzeugen.

Da der unter den in Tabelle VII verzeichneten Versuchsbedingungen erhaltene Niederschlag offenbar, weil er bei 120° C scharf getrocknet wurde, keine nennenswerten Mengen von Wasser abgab, konnte eine während des Glühens im O-Strome erfolgende Gewichtszunahme, nur von der Oxydation von Cu_2O zu CuO herrührend, dem aufgenommenen Sauerstoff gleichgesetzt werden. Aus diesem konnte daher berechnet werden, wieviel Cu_2O im Niederschlag enthalten war; aus dem Unterschied zwischen der abgewogenen Substanzmenge und dem so berechneten Cu_2O mußte sich aber das vorhanden gewesene CuO ergeben. Weiterhin konnte aus den für Cu_2O und CuO erhaltenen Werten der gesamte Cu-Gehalt der abgewogenen Substanz berechnet werden, der wieder, wenn meine Annahme über die Zusammensetzung der Substanz richtig ist, mit der Cu-Menge übereinstimmen muß, die man durch Reduktion im H-Strom erhält; endlich muß diese Cu-Menge, wenn sie auf das Gewicht der im O-Strom geglühten Substanz bezogen wird, den für CuO berechneten Cu-Gehalt von 79,9% aufweisen.

Die Versuche, deren Ergebnisse in nachstehender Tabelle VII verzeichnet sind, wurden einmal bei identischer Zucker- und Kupferkonzentration und *verschiedenen Kochzeiten* ausgeführt; weiterhin aber bei identischer Zuckerkonzentration und Kochzeit, bei *Variation der Kupferkonzentration.*

Tabelle VII.

Analysierte Substanz g	Gewichtszunahme = O_2-Aufnahme g	Cu_2O aus der O_2-Aufnahme berechnet g	Substanz minus Cu_2O = CuO g	Die Substanz enthält: Cu_2O %	CuO %	Cu: aus Cu_2O plus CuO berechnet g	Cu: durch Reduktion erhalten g	Cu: in der in O_2 geglühten Substanz %	Herstellungsweise der Substanz
0,1524	0,0081	0,0725	0,0799	47,5	52,5	0,1282	0,1277	79,6	Zucker 40 mg $CuSO_4$ 70 g in 500 ccm Kochzeit 50′.
0,1488	0,0089	0,0796	0,0692	53,5	46,5	0,1260	0,1253	79,5	
0,1562	0,0089	0,0796	0,0766	51,0	49,0	0,1319	0,1312	79,5	
0,1561	0,0076	0,0680	0,0881	43,6	56,4	0,1308	0,1303	79,6	
0,1662	0,0161	0,1440	0,0222	86,7	13,3	0,1456	0,1457	79,9	Wie oben, doch Kochzeit 3′.
0,1551	0,0151	0,1351	0,0200	87,1	12,9	0,1360	0,1359	79,9	
0,1517	0,0164	0,1467	0,0050	96,7	3,3	0,1343	0,1340	79,7	Zucker 40 mg Kochzeit 60′ $CuSO_4$ 50 g pro 500 ccm.
0,1514	0,0160	0,1431	0,0083	94,5	5,5	0,1337	0,1337	79,9	
0,1509	0,0147	0,1315	0,0194	87,2	12,8	0,1326	0,1321	79,8	Wie oben, doch 60 g $CuSO_4$.
0,1608	0,0157	0,1405	0,0203	87,4	12,6	0,1410	0,1413	80,1	
0,1612	0,0113	0,1011	0,0601	62,7	37,3	0,1378	0,1375	79,7	Wie oben, doch 70 g $CuSO_4$.
0,1605	0,0115	0,1029	0,0576	64,1	35,9	0,1374	0,1368	79,5	

Die überraschende Übereinstimmung zwischen den berechneten und gefundenen Cu-Mengen macht es zweifellos, daß die oben erwähnte Annahme richtig war: *Wird in einer Reduktionsprobe*, die man zur Zuckerbestimmung ausführt, *$CuSO_4$ in größerer Konzentration verwendet und länger als vorgeschrieben gekocht, so bildet sich neben rotem Cu_2O dasselbe braunschwarze CuO, das man im Kupfersulfat-Seignettesalz-Laugengemisch, oder auch im Kupfersulfat-Laugengemisch allein erhält.*

Auch läßt sich nachweisen, daß an der Bildung des Reaktionsproduktes Cu_2O und CuO zu wechselnden Anteilen beteiligt sind. Wird z. B. nur 3 Minuten lang gekocht, so entsteht weit mehr Cu_2O als CuO; wird 50 Minuten lang gekocht, entstehen beide ungefähr in denselben Mengen.

Wird die Konzentration des angewendeten $CuSO_4$ variiert, so wird bei geringer $CuSO_4$-Konzentration viel Cu_2O neben sehr wenig CuO gebildet; bei steigender $CuSO_4$-Konzentration nimmt die Menge des Cu_2O ab, die des CuO zu.

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung des Herrn Prof. *Paul Hári* ausgeführt.

Über den verschiedenen Schwefelgehalt der Hämoglobine verschiedenen Ursprungs.

Von

Jolán Valer.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 7. Oktober 1927.)

Überblickt man die in nachstehender Tabelle I zusammengestellten älteren Daten über den Eisengehalt des Hämoglobins, wie er von verschiedenen Autoren (an Blutarten, auf die sich meine Versuche beziehen) erhalten wurde, so ist es begreiflich, daß die bekannte Theorie über die Existenz verschiedener Hämoglobine, sowie auch der Begriff der spezifischen Sauerstoffkapazität des Hämoglobins (Sauerstoffkapazität pro 1 g Eisen) entstehen konnten. Auf Grund der auffallend gut übereinstimmenden Daten, die sich in der unteren Hälfte der Tabelle I befinden, konnte es aber keinem Zweifel mehr unterliegen, daß *alle Hämoglobine denselben Eisengehalt* haben, daher es zwangläufig angenommen werden mußte, daß alle diesbezüglich untersuchten Tiere dasselbe Hämoglobin in ihren roten Blutkörperchen führen. Dies mutet auch angesichts der identischen Bestimmung des Hämoglobins im Haushalt der verschiedenen Organismen, in der großen physikalischen und chemischen Ähnlichkeit der aus verschiedenen Blutarten dargestellten Hämoglobine als sehr plausibel an. Andererseits läßt es sich aber nicht verschweigen, daß es auch wenig geklärte Verschiedenheiten im Verhalten der Hämoglobine verschiedenen Ursprungs (in der Wasserlöslichkeit, teilweise auch in der Kristallform) gibt; als gänzlich ungeklärt müssen aber die ebenfalls aus Tabelle I ersichtlichen großen Schwankungen im *Schwefelgehalt* angesehen werden, wie sie von verschiedenen Autoren an derselben Tierart bzw. an verschiedenen Tierarten gefunden wurden. Diese Verhältnisse zu klären, schien eine dankbare Aufgabe zu sein, denn es konnte sich ebensogut herausstellen, daß obige Diskrepanzen von Analysenfehlern herrühren und die Einheitlichkeit des Hämoglobins auch bezüglich seines Schwefelgehaltes sicher-

gestellt wird; oder aber, daß Unterschiede im Schwefelgehalt sicher bestehen, daher auch die Existenz verschiedener Hämoglobine zugegeben werden muß.

Sämtliche bisher ausgeführten Schwefelbestimmungen wurden gravimetrisch ausgeführt, und zwar wurde der Schwefel stets nach Veraschung des Hämoglobins als $BaSO_4$ gewogen. Wenn man bedenkt,

Tabelle I.

Tierart	Fe %	S %	
Pferd	0,47	0,65	*Kossel*[1], 1878
	0,45	0,67	*Otto*[2], 1883
	0,47	0,65	*Bücheler*[3], 1883
	0,468	0,65	*Hüfner*[4], 1884
Hund	0,43	0,39	*Hoppe-Seyler*[5], 1860
	0,42	0,63	*Otto*[6], 1883
Rind	0,40	0,45	*Hüfner*[7], 1886
Pferd	0,393	0,449	*Jütt*[8], 1895
	—	0,43	*Schulz*[9], 1898
	0,38	0,42	*Abderhalden*[10], 1903
Katze	0,35	0,62	*Abderhalden*[11], 1909
Pferd	0,336	0,391	*Zinoffsky*[12], 1886
	0,326	0,362	
	0,336	0,389	
Hund	0,333	0,54	*Jaquet*[13], 1888
	0,336	0,57	1890
Rind	0,336	—	*Hüfner* und *Jaquet*[14], 1894
	0,337	—	*Butterfield*[15], 1909
Hund	0,333	—	*Haurowitz*[16], 1924

[1] Zeitschr. f. physiol. Chem. **2**, 149, 1878.
[2] Pflügers Arch. **31**, 240, 1883.
[3] Jahresb. über d. Fortschritte d. Tierchem. **14**, 111, 1884 (Inaug.-Dissertation).
[4] Zeitschr. f. physiol. Chem. **8**, 358, 1884.
[5] Abderhaldens Biochem. Handlexikon.
[6] Zeitschr. f. physiol. Chem. **7**, 57, 1883.
[7] Jahresber. über d. Fortschritte d. Tierchem. **17**, 113, 1886.
[8] Ebendaselbst **25**, 128, 1895 (Inaug.-Diss.).
[9] Zeitschr. f. physiol. Chem. **24**, 449, 1898.
[10] Ebendaselbst **37**, 484, 1903.
[11] Abderhaldens Lehrb. d. physiol. Chem. 1920, S. 743.
[12] Zeitschr. f. physiol. Chem. **10**, 16, 1886.
[13] Ebendaselbst **12**, 285, 1888; **14**, 289, 1890.
[14] Arch. f. Anat. u. Physiol. 1894, S. 130 bis 175.
[15] Zeitschr. f. physiol. Chem. **62**, 173, 1909.
[16] Ebendaselbst **136**, 147, 1924.

daß man, um nur etwa 0,2 g $BaSO_4$ wägen zu können, von einem 1% Schwefel enthaltenden Stoff gegen 3 g veraschen muß, ferner der Schwierigkeiten der Veraschung von Eiweißstoffen eingedenk ist, so muß es als großer Fortschritt erachtet werden, wenn die Bestimmung nach dem von *ter Meulen*[1] angegebenen Verfahren vorgenommen werden kann, das außer anderen den sehr großen Vorteil bietet, daß hierzu weit geringere Substanzmengen genügen. Um von kleineren Tieren hinreichend große Mengen von mehrmals umkristallisiertem Hämoglobin zur Ausführung der älteren Methoden zu erhalten, konnte es bei dem immerhin verlustreichen Kristallisieren und Umkristallisieren oft nicht vermieden werden, daß aus dem Blut verschiedener Tierindividuen dargestellte verhältnismäßig kleine Hämoglobinmengen zum Schluß vereinigt und so analysiert werden mußten, insbesondere wenn man mehrere Parallelanalysen ausführen wollte, was durchaus nötig ist. Zu welchen Fehlern aber die Analyse an Hämoglobin führen kann, das von verschiedenen Tierindividuen stammt und nicht gesondert untersucht wird, ist aus meinen weiter unten am Hundehämoglobin gemachten Erfahrungen zu ersehen.

Da das *ter Meulen*sche Verfahren an einer wenig zugänglichen Stelle mitgeteilt ist, soll es hier kurz, jedoch in allen wesentlichen Einzelheiten beschrieben werden; allerdings mit einigen geringfügigen Änderungen, die sich mir als nützlich erwiesen hatten.

Das Verfahren beruht auf der Tatsache, daß schwefelhaltige organische Stoffe, in einem Wasserstoffstrom geglüht, ihren gesamten Schwefel in Form von H_2S an vorgelegte Lauge abgeben, falls für einen entsprechenden Katalysator dieses Vorgangs gesorgt wird.

Versetzt man dann die Lauge mit einem abgemessenen Volumen einer Jodlösung von bekannter Konzentration, so läßt sich durch Rücktitration mit Natriumthiosulfat unter Verwendung von Stärke als Indikator bestimmen, wieviel Jod durch H_2S gebunden wurde.

Die zu untersuchende Substanz wird laut Vorschrift in ein 15 mm langes, 4 mm hohes Platinschiffchen eingefüllt, dieses in eine 40 cm lange Verbrennungsröhre aus durchsichtigem Quarz mit der lichten Weite von 1 cm eingebracht; jedoch hat es sich mir, um die Substanz in der Platinschale vor vorzeitiger Erwärmung bzw. Zersetzung zu bewahren, als zweckmäßig erwiesen, ein Rohr von 50 bis 60 cm Länge und 14 mm lichter Weite zu verwenden. Auch habe ich angesichts der Schwefelarmut des Hämoglobins, von dem entsprechend größere Mengen analysiert werden müßten, ein 60 mm langes und 7 mm hohes Platinschälchen verwenden müssen.

Nach einer ganzen Anzahl von vorbereitenden Versuchen mit der Methode hinreichend bewandert, konnte ich statt der durchsichtigen, sehr kostspieligen Quarzröhre eine zweimal geschmolzene, bloß durchscheinende, weit billigere Vitreosilröhre verwenden.

---

[1] *H. ter Meulen*, Receuil des travaux chimiques des Pays-Bas **41**, 4. Serie; **3**, Nr. 2, 1922.

Das Rohr enthält gegen das dem Schiffchen abgekehrte Ende zu als Katalysator eine etwa 20 cm lange Lage aus platiniertem Asbest. Dieses wird bereitet, indem Asbest mit einer 10%igen Lösung von Platinchlorid durchtränkt, getrocknet, dann geglüht und im Verbrennungsrohr durch Glühen im Wasserstoffstrom reduziert wird.

Das das Platinschiffchen beherbergende Ende der Verbrennungsröhre steht unter Vermittlung zweier mit $KMnO_4$ bzw. Sublimat beschickter Waschflaschen mit einem Wasserstoffentwicklungsapparat (beschickt mit arsenfreiem Zink und Salzsäure) in Verbindung, und zwar so, daß die abführende Röhre der zweiten Waschflasche durch die Bohrung eines Korkstopfens tritt, mit dem das Verbrennungsrohr verschlossen ist. Ein Korkstopfen muß an Stelle eines solchen aus Gummi verwendet werden, da letzterer schwefelhaltige flüchtige Produkte abgeben könnte. Der Korkstopfen wird mit geschmolzenem Paraffin gedichtet.

An das dem Platinschiffchen abgekehrte Ende des Verbrennungsrohres werden 40 ccm 10%iger Natronlauge in einem Kölbchen vorgelegt und dieses an eine Wasserstrahlluftpumpe angeschlossen.

Der Stopfen, mit dem man das Kölbchen verschließt, ist doppelt durchbohrt und durch beide Bohrungen sind Glasröhren gesteckt. Das Verbrennungsrohr ist an diesem Ende so ausgezogen, daß es mit der nahe zum Boden des Kölbchens reichenden Röhre mittels eines Gummischlauchstücks (Glas an Glas) verbunden werden kann. Die andere Röhre ist mit der Pumpe verbunden. Ich habe vorsichtshalber stets ein zweites Kölbchen angewendet, doch in der Lauge niemals eine Spur H_2S nachweisen können, das der Bindung durch die Lauge im ersten Kölbchen entgangen wäre. Das Ansaugen mit der Pumpe geschieht mit einem ganz geringen Unterdruck und hat nur den Zweck, den durch das Platinasbest verursachten Widerstand zu überwinden. Soll eine Analyse ausgeführt werden, so schiebt man zunächst das Schiffchen mit der Substanz in das Verbrennungsrohr, verschließt dieses, stellt die Verbindungen her, setzt die Pumpe in langsamen Gang und läßt nun Wasserstoff in langsamem Strome durch den Apparat streichen. Sobald alle Luft durch den Wasserstoff verdrängt ist, erhitzt man das Platinasbest mittels drei daruntergestellter *breiter* Bunsenflammen bis zur Rotglut; erhitzt dann allmählich mit einer solchen Flamme denjenigen Teil des Verbrennungsrohres, welcher das Platinschiffchen mit der Substanz enthält. Der Wasserstoff muß ganz langsam, Blase für Blase, durch die Lauge perlen. Wenn von schwefelreichen Stoffen laut Vorschrift etwa 0,02 g analysiert werden, so ist die Analyse in etwa 20 Minuten beendet; bei dem von mir untersuchten schwefelarmen Hämoglobin mußte stets eine halbe Stunde lang geglüht werden.

Da die Substanz im Wasserstoffstrom selbstverständlich nicht verbrennen kann, verbleiben nach jeder Analyse kohlenstoffreiche Reste im Schiffchen. Diese müssen, um eine neue Analyse ausführen zu können, weggeschafft werden, was dadurch möglich ist, daß man das Schiffchen an seinem Orte beläßt und in einem Strome von Luft glüht.

An manchen Stoffen sind die kohlenstoffreichen Reste in kürzester Zeit weggebrannt. Eiweißstoffe, wie auch das von mir untersuchte Hämoglobin, blähen sich während des Glühens im Wasserstoffstrom, auch wenn man ganz allmählich erhitzt, zu einer voluminösen Masse auf, die, aus dem Schiffchen hervorquellend, oft einen großen Teil des Lumens des Verbrennungsrohres einnimmt und hinterher nur schwer und langsam verbrennt. Wenn die zu verbrennende organische Substanz auch Metall enthält, so

entstehen während des Glühens Metallsulfide, die den Schwefel auch im Wasserstoffstrom *nicht* abgeben. In solchen Fällen muß nach dem Abkühlen der Rest im Schiffchen mit ein wenig Borax versetzt und ein zweitesmal im Wasserstrom geglüht werden. Infolge des oben erwähnten Verhaltens des Hämoglobins, das das Schiffchen während des Glühens zum großen Teile verläßt, war an das zweite Glühen mit Borax beim Hämoglobin nicht zu denken. (Daß hieraus kein Fehler resultieren konnte, wird an einer anderen Stelle gezeigt.) Siehe die nachfolgende Mitteilung von *E. Kaiser* in dieser Zeitschrift.

Nach beendetem Glühen wird die vorgelegte Lauge mit 10 ccm auf 50 ccm verdünnter Salzsäure übersäuert, mit 20 ccm n/100 Jodlösung versetzt und mit n/100 Natriumthiosulfat zurücktitriert.

Fehlanalysen können dadurch erhalten werden, daß sich am Platinasbest Kohle abgelagert hat. In solchen Fällen, die an den ganz absurden Ergebnissen sofort zu merken sind, muß neu platiniertes Asbest verwendet werden.

Ehe mit den eigentlichen Versuchen begonnen wurde, habe ich, um mich von der hinreichenden Sicherheit in der Handhabung des Apparats zu vergewissern, Analysen an selbst dargestelltem, mehrfach umkristallisiertem Cystin ausgeführt. Bei dem geringen zu erwartenden Schwefelgehalt des Hämoglobins und bei der Unmöglichkeit, größere Mengen desselben im Quarzrohr zu zersetzen, mußte ich, um vergleichbare Versuchsbedingungen zu schaffen, auch entsprechend geringe Cystinmengen, 5 bis 10 bis 15 mg, verwenden. Diese abzuwägen, war mangels einer Mikrowage ein aussichtsloses Unterfangen; daher löste ich eine größere Menge Cystin in 10%igem Ammoniak, brachte von dieser Lösung 1 ccm mittels einer geeichten Pipette in das Platinschiffchen und trocknete bei 90° C. Die Analyse ergab, wie aus nachfolgender Tabelle II hervorgeht, recht befriedigende Ergebnisse, so daß nunmehr mit den eigentlichen Versuchen an Hämoglobin begonnen werden konnte.

Tabelle II.

Cystin analysiert	Schwefel			
	berechnet	gefunden	gefunden	mehr (+) bzw. weniger (—) gefunden
mg	mg	mg	%	%
45,3	12,08	11,81	26,1	— 2,23
15	3,999	3,912	26,1	— 2,17
15	3,999	3,882	25,9	— 2,92
15	3,999	3,935	26,2	— 1,60
10	2,666	2,666	26,7	± 0
10	2,666	2,638	26,4	— 1,05
5	1,333	1,366	27,3	+ 2,47
5	1,333	1,312	26,2	— 1,57
5	1,333	1,360	27,2	+ 2,02
5	1,333	1,366	27,3	+ 2,47
5	1,333	1,325	26,6	— 0,60
5	1,333	1,350	27,1	+ 1,27
5	1,333	1,310	26,2	— 1,72
			Mittelwert:	— 0,5

Oxyhämoglobin wurde in der bekannten Weise aus Blut von Pferden, Hunden, Rindern und Katzen dargestellt, mindestens zweimal,

Tabelle III.

Tierart	Präparat Nr.	Schwefelbestimmung: Analysierte Substanz g	Schwefel gefunden mg	Schwefel gefunden %	Eisenbestimmung: Analysierte Substanz g	Eisen gefunden mg	Eisen gefunden %	Umkristallisiert
Katze	I	0,252	2,435	0,97				3 mal
		0,252	2,397	0,95				
		0,250	2,398	0,96				
			Mittelwert:	0,96				
	II	0,250	2,400	0,96	0,697	2,28	0,327	3 mal
		0,252	2,435	0,97				
		0,250	2,427	0,97				
		0,252	2,435	0,97				
			Mittelwert:	0,97				
	III	0,248	2,416	0,97	0,584	1,95	0,334	3 mal
		0,250	2,424	0,97				
			Mittelwert:	0,97				
	IV	0,247	2,442	0,99				2 mal
Pferd	I	0,261	1,480	0,57	0,756	2,45	0,324	3 mal
		0,262	1,573	0,60	0,760	2,50	0,330	
		0,264	1,613	0,61				
		0,259	1,448	0,56				
		0,268	1,510	0,56				
			Mittelwert:	0,58		Mittelw.:	0,327	
	II	0,250	1,387	0,55				3 mal
		0,236	1,346	0,57				
		0,254	1,518	0,60				
		0,252	1,397	0,55				
			Mittelwert:	0,57				
	III	0,255	1,443	0,57	0,761	2,44	0,320	3 mal
		0,252	1,426	0,57	0,751	2,44	0,324	
		0,254	1,410	0,55				
		0,252	1,362	0,54				
			Mittelwert:	0,56		Mittelw.:	0,322	
	IV	0,250	1,467	0,59	0,580	1,85	0,320	
		0,250	1,437	0,57	0,728	2,42	0,345	
			Mittelwert:	0,58		Mittelw.:	0,332	
	V	0,237	1,366	0,58				3 mal
		0,250	1,373	0,55				
			Mittelwert:	0,57				
	VI	0,250	1,419	0,56	0,753	2,53	0,337	3 mal
		0,250	1,504	0,60				
		0,250	1,424	0,57				
			Mittelwert:	0,58				
	VII	0,250	1,166	0,47				3 mal
		0,250	1,163	0,47				
			Mittelwert:	0,47				

Tabelle III (Fortsetzung).

Tierart	Präparat Nr.	Schwefelbestimmung: Analysierte Substanz g	Schwefel gefunden mg	Schwefel gefunden %	Eisenbestimmung: Analysierte Substanz g	Eisen gefunden mg	Eisen gefunden %	Umkristallisiert
Rind	I	0,250	1,477	0,59	0,752	2,47	0,328	3 mal
		0,252	1,504	0,60				
		0,250	1,408	0,56				
		0,250	1,437	0,57				
		0,252	1,413	0,56				
			Mittelwert:	0,58				
	II	0,250	1,398	0,56				2 mal
		0,250	1,394	0,56				
		0,250	1,501	0,60				
		0,250	1,501	0,60				
		0,255	1,466	0,57				
			Mittelwert:	0,58				
	III	0,252	1,483	0,59	0,752	2,51	0,334	3 mal
		0,251	1,448	0,58				
			Mittelwert:	0,585				
	IV	0,250	1,488	0,60	0,621	2,09	0,337	2 mal
		0,250	1,453	0,57				
		0,261	1,514	0,58				
			Mittelwert:	0,58				
Hund	I	0,282	2,058	0,73	0,757	2,49	0,330	3 mal
		0,249	1,747	0,70				
		0,252	1,694	0,67				
		0,248	1,682	0,68				
		0,248	1,755	0,71				
			Mittelwert:	0,70				
	II	0,250	1,491	0,60	0,755	2,51	0,332	3 mal
		0,250	1,531	0,61	0,574	1,96	0,341	
		0,250	1,512	0,60				
		0,250	1,536	0,61				
		0,251	1,576	0,63				
			Mittelwert:	0,61		Mittelw.:	0,337	
	III	0,250	1,413	0,56	0,635	2,07	0,326	3 mal
		0,250	1,403	0,56	0,755	2,47	0,327	
		0,255	1,448	0,57				
		0,250	1,438	0,58				
		0,250	1,448	0,58				
		0,250	1,499	0,60				
		0,250	1,398	0,56				
			Mittelwert:	0,57		Mittelw.:	0,327	
	IV	0,255	1,288	0,51	0,752	2,50	0,331	3 mal
		0,255	1,297	0,51	0,753	2,51	0,333	
		0,254	1,325	0,52				
			Mittelwert:	0,51		Mittelw.:	0,332	

in der Regel dreimal umkristallisiert, jedoch niemals so, daß hierzu vereinigtes Blut verschiedener Tierindividuen benutzt worden wäre. (Schwierigkeiten ergaben sich bloß bei der Darstellung des Rinderhämoglobins, denn die vorgeschriebene Menge Alkohol hatte nicht genügt; die wässerige Lösung des Blutfarbstoffes mußte anteilweise, nach jedesmaligem intensiven Kühlen bis zu einem Gehalt von über 40 % mit Alkohol versetzt werden, um endlich Kristalle zu erhalten.)

Die so gewonnenen Präparate wurden erst oberflächlich, dann im pulverisierten Zustande im Dampftrockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann nach Tunlichkeit von jedem Präparate mehrere Proben parallel analysiert.

Obzwar die Reinheit der Präparate durch das wiederholte Umkristallisieren hinreichend gesichert erschien, habe ich zum Überfluß auch in der großen Mehrzahl desselben den Eisengehalt nach *Willstätter*[1] bestimmt, der, wie hier vorweggenommen werden darf, überraschend gut mit den eingangs erwähnten neuen Bestimmungen übereinstimmte. Von allen Versuchsergebnissen, die in Tabelle III zusammengestellt sind, seien zunächst die vollkommen eindeutigen an Katzen- und Rinderhämoglobin erhaltenen Resultate mitgeteilt.

Katzen- und Rinderhämoglobin.

Das Überraschende am Katzen- und Rinderhämoglobin ist der große, dabei aber vollständig sichergestellte Unterschied im Schwefelgehalt an je 4 Exemplaren der betreffenden Tierart. Suchen wir das minimale Molekulargewicht aus dem experimentell bestimmten Eisen- und Schwefelgehalt zu berechnen, so ergeben sich die minimalen Molekulargewichte:

	Minimales Molekulargewicht
Katzenhämoglobin:	
aus Eisen $\frac{55,8 \cdot 100}{0,33}$	16 900
aus Schwefel $\frac{32 \cdot 100}{0,97}$	3 299 (5 . 3299 = 16 500)
Rinderhämoglobin:	
aus Eisen $\frac{55,8 \cdot 100}{0,33}$	16 900
aus Schwefel $\frac{32 \cdot 100}{0,58}$	5 517 (3 . 5517 = 16 550)

[1] Hoppe-Seyler-Thierfelders Handb. d. phys.- u. pathol.-chem. Analyse 9. Aufl., S. 663. Springer 1924.



Daraus ergibt sich also, daß dem Katzenhämoglobin sowohl wie dem Rinderhämoglobin aus dem Eisen berechnet ein minimales Molekulargewicht von je 16900 zukommt, wobei aber im ersteren auf 1 Atom Eisen 5 Atome Schwefel entfallen, also FeS_5; im zweiten aber 3 Atome Schwefel, also FeS_3. Dann lauten aber die aus dem Schwefel berechneten Molekulargewichte: 16500 und 16550, sind also bloß um 2,5 % kleiner als die aus dem Eisengehalt berechneten.

Rechnen wir nicht mit dem von mir erhobenen Eisengehalt, sondern mit dem Mittelwert der höchst verläßlichen Daten der in Tabelle I zuletzt genannten vier Autoren, also mit 0,334 %, so ergibt sich hieraus ein minimales Molekulargewicht von 16707, von dem meine aus dem Schwefelgehalt berechneten nur um 1,2 % abweichen, eine Übereinstimmung, die nichts zu wünschen übrig läßt.

Pferdehämoglobin.

Bei den sechs ersten von je einem Pferde herstammenden Hämoglobinpräparaten betrug das minimale Molekulargewicht:

	Minimales Molekulargewicht
aus Eisen $\frac{55{,}8 \cdot 100}{0{,}330}$	16 900
aus Schwefel $\frac{32 \cdot 100}{0{,}57}$	5 614 (3 . 5614 = 16 840)

Also entfallen hier wieder, wie beim Rind, auf 1 Atom Eisen 3 Atome Schwefel, also FeS_3; es ist das auf dieser Grundlage berechnete Molekulargewicht von 16840 bloß um 0,6 % kleiner, als das aus meinen Eisendaten berechnete, und um denselben Betrag größer, als das aus den Literaturdaten berechnete Molekulargewicht.

Auffallend ist der weit niedrigere Schwefelgehalt des siebenten von mir untersuchten Pferdehämoglobins; es beträgt hier das minimale Molekulargewicht:

	Minimales Molekulargewicht
aus Schwefel berechnet $\frac{32 \cdot 100}{0{,}47}$	6807

Wäre an diesem Präparat wie an anderen eine Eisenbestimmung vorgenommen worden, was leider nicht der Fall war, so bliebe dieser vereinzelte Befund ebenso merkwürdig wie auch ganz sichergestellt. Mangels dieser wichtigen Zahl wird man nur sagen können: falls der Eisengehalt auch an diesem Präparate 0,33 %, daher das daraus be-

rechnete minimale Molekulargewicht, wie an den übrigen Pferdehämoglobinpräparaten 16900 betragen hätte, so würde hieraus folgen, daß in diesem Hämoglobin auf 2 Atome Eisen 5 Atome Schwefel entfallen, also Fe_2S_5; woraus sich, aus dem Eisen berechnet, als wirkliches Molekulargewicht 33800, aus dem Schwefel aber ein solches von 34025 errechnen ließe, also um bloß etwa 0,6% mehr. Also hätte man es in diesem Falle mit einem Doppelmolekül zu tun, das in den beiden Hämatinkomponenten naturgemäß je ein Eisenatom enthält, während die eisenfreie Komponente durch ein Globinmolekül gebildet wird, das doppelt so groß als gewöhnlich ist und 5 Atome Schwefel enthält.

Hundehämoglobin.

Ist das Verhalten des Pferdehämoglobinpräparates Nr. VII an sich schon auffallend, so ist dies an den vier von je einem Hunde herrührenden Präparaten noch in weit höherem Grade der Fall *Der Schwefelgehalt stimmt an keinem einzigen Präparat mit dem eines anderen überein* und enthält das schwefelreichste beinahe um die Hälfte mehr als das schwefelärmste.

Am nächsten lag es, an Versuchsfehler zu denken. Es hätte z. B. sein können, daß zur Zeit, wo die anderen Hämoglobine untersucht wurden, der Apparat in tadelloser Ordnung und auch der Titer der verwendeten Jod- und Natriumthiosulfatlösungen tadellos war, bei der Untersuchung der Hundehämoglobine aber irgend ein Fehler sich eingeschlichen hat. Diese Bedenken lassen sich aber sofort zerstreuen, wenn man an nachfolgender Zusammenstellung die chronologische Reihenfolge der vorgenommenen Schwefelbestimmungen ins Auge faßt.

21. bis 23. März,	Präparat	I (Pferd)	0,58%	Mittelwert
29. März bis 1. April,	„	I (Hund) . . .	0,70%	„
14. April,	„	I (Katze) . . .	0,96%	„
8. bis 13. April,	„	II (Pferd)	0,57%	„
26. April,	„	II (Katze) . . .	0,97%	„
1. Mai,	„	VII (Pferd)	0,47%	„
5. Juni,	„	III (Pferd)	0,56%	„
6. Juni,	„	IV (Pferd)	0,58%	„
7. Juni,	„	V (Pferd)	0,57%	„
13. Juli,	„	II (Hund) . . .	0,61%	„
18. Juli,	„	III/IV (Katze) . .	0,97/0,99%	„
20. Juli,	„	I (Rind)	0,58%	„
21. Juli,	„	III (Hund) . . .	0,57%	„
24. Juli,	„	II (Rind)	0,58%	„
25. Juli,	„	VI (Pferd)	0,58%	„
8. August,	„	III (Rind)	0,85%	„
10. August,	„	IV (Hund) . . .	0,51%	„
12. August,	„	IV (Rind)	0,58%	„
14. August,	„	IV (Hund) . . .	0,52%	„

Aus dieser Zusammenstellung ergibt sich der zur Beurteilung sehr günstige Zufall, daß vom Hunde herrührende Präparate *nicht hintereinander* analysiert wurden, sondern zeitlich jedesmal zwischen solche fielen (z. B. vorher Pferde-, nachher Katzenhämoglobin), deren Schwefelgehalt unanfechtbar richtig festgestellt war. Angesichts des tadellosen Funktionierens des Schwefelbestimmungsapparates an den übrigen Hämoglobinen konnten also die merkwürdigen Ergebnisse *nicht* durch eine fehlerhafte Analyse bedingt sein, wohl aber etwa durch Unreinheit der Präparate. Denn es konnte, wenn auch mit wenig Wahrscheinlichkeit, angenommen werden, daß gerade Hundehämoglobin auch nach wiederholtem Umkristallisieren von Beimischungen (z. B. durch Serumeiweißkörper) verunreinigt ist. Daß jedoch auch dies nicht der Fall sein konnte, geht aus den Eisenbestimmungen hervor, die an den vier Präparaten untereinander hinreichend, in ihrem Mittelwert aber mit den von mir an anderen Hämoglobinarten erhaltenen Werten sowohl, wie auch mit den anerkannt guten Werten der eingangs erwähnten Autoren vorzüglich übereinstimmen. Den durchaus verschiedenen Schwefelgehalt der von verschiedenen Hunden herrührenden Hämoglobine müssen wir daher als gegebene Tatsache hinnehmen. Sucht man, wie dies am Katzen-, Rinder- und Pferdehämoglobin geschah, an den Hundehämoglobinen das minimale Molekulargewicht aus dem Schwefelgehalt zu berechnen, so ergeben sich die folgenden Werte.

$$\text{Präparat I} \quad \frac{32 \,.\, 100}{0{,}70} = 4571,$$

$$\text{,, II} \quad \frac{32 \,.\, 100}{0{,}61} = 5246,$$

$$\text{,, III} \quad \frac{32 \,.\, 100}{0{,}57} = 5614,$$

$$\text{,, IV} \quad \frac{32 \,.\, 100}{0{,}51} = 6274.$$

Der am Präparat III erhaltene Wert stimmt vollkommen mit dem überein, der am Pferdehämoglobin, hinreichend gut mit dem, der am Rinderhämoglobin erhalten wurde; daher auch hier auf 1 Atom Eisen 3 Atome Schwefel (also FeS_3) entfallen. Bezüglich aller anderer Hunde-Hämoglobinpräparate wäre es meines Erachtens gekünstelt und nicht gerechtfertigt, eine Anzahl von Formeln und hieraus Riesen-Moleküle zu errechnen. Weit wahrscheinlicher ist es, anzunehmen, daß im Hundeblut zwei oder mehrere Hämoglobine enthalten sind, die sich nur bezüglich ihres Schwefelgehaltes voneinander unterscheiden, wobei immerhin die Frage offen bleibt, warum dies gerade am Hunde und nicht

auch an den anderen untersuchten Tieren der Fall ist. Dies zu entscheiden, sind in unserem Institute Versuche im Gange, über die seinerzeit berichtet werden soll.

Als vollkommen sichergestellte Tatsache geht jedoch aus den oben mitgeteilten Versuchen hervor, daß die *Einheitlichkeit der Hämoglobine verschiedenen Ursprungs*, die durch den identischen Eisengehalt vorgetäuscht wurde, *nicht besteht*.

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung des Herrn Prof. *Paul Hári* ausgeführt.

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

Nr. 111.

Der Einfluß von Milz- und Knochenmarksextrakten auf die Blutregeneration nach Blutentzug.

Von

Tateyoshi Honda.

[Aus dem Physiologischen Institut (Hallerianum) der Universität Bern.]

(Eingegangen am 26. September 1927.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

Eine ganze Anzahl von Untersuchungen aus dem Berner Physiologischen Institut hatte in bezug auf die Funktionen in Milz und Knochenmark Ergebnisse gezeitigt, welche zu dem Schluß führen, daß das Vorhandensein der Milz einen gewissen hemmenden Einfluß auf die Funktion des Knochenmarks ausübt. Voraussetzung ist dabei, daß auf andere gleichzeitig obwaltende Versuchsbedingungen geachtet wird, denn die Funktion, die die Grundlage der Untersuchung bildet, nämlich die Bildung von roten Blutkörperchen, hängt von einer ganzen Reihe von Versuchsvariablen ab, so daß nicht unbedingt die Änderung einer Variablen eine eindeutig bestimmte Folge zu haben braucht.

Die Tatsachen selbst, auf die hier Bezug genommen wird, sind recht umstritten. Es gibt Beobachtungsreihen, deren Ergebnisse genau zum umgekehrten Schlusse führen. Hier kommen insbesondere die interessanten Arbeiten von *Leake*[1] und seinen Mitarbeitern in Betracht. Diese Autoren fanden in Untersuchungen an Hunden und Menschen, daß die kombinierte Darreichung von Knochenmark und

[1] *Chauncey D. Leake*, The Journ. of Pharm. and exper. Ther. **22**, 401, 1923. *Leake* and *Evans*, Wiskonsin Medical Journ. **22**, 1, 1923; **23**. 1, 1924.

Milzextrakt die Anämie günstig beeinflußt. Es war wegen dieser Beobachtungen, daß ich auf Anregung von Prof. *Asher* die Frage in Angriff nahm, ob eine experimentell herbeigeführte Anämie günstig beeinflußt würde, wenn während der Regenerationsperiode Milz bzw. Milz und Knochenmark gereicht wird. Die wichtigen Arbeiten der *Vérzar*schen Schule kamen mir erst nach Abschluß meiner Untersuchung zur Kenntnis.

Als Versuchstiere wählte ich Kaninchen. Es wurden sechs Tiere von gleichem Alter, gleicher Rasse und gleichem Gewicht benutzt. Es wurde dafür gesorgt, daß die Ernährungsbedingungen bei allen Tieren möglichst gleich gehalten wurden. Zwei Kaninchen dienten als Kontrolle, die anderen vier erhielten nach dem Blutentzug Knochenmarks- und Milzpräparate. Die Eingabe der Präparate wurde so geregelt, daß das eine Kaninchen nur Knochenmark, das zweite nur Milztabletten, die zwei anderen Knochenmark *und* Milztabletten zusammen erhielten. Die experimentelle Anämie wurde durch Blutentzug in Morphiumnarkose erzeugt. In der üblichen Weise wurden unter strenger Asepsis die Carotis freigelegt und 30 bis 35 ccm Blut entzogen. 3 bis 6 Stunden nach der Operation erwachten die Tiere aus der Narkose, bewegten sich munter und nahmen die dargebotene Nahrung auf. Das äußere Verhalten der Tiere wich in nichts von demjenigen normaler milzoperierter Tiere ab. Der Verlauf der Blutregeneration wurde mit Hilfe von Bestimmungen des Hämoglobingehalts vermittelst des *Sahli*schen Hämometers bestimmt. Das Blut wurde zu diesem Zwecke aus der Ohrvene entnommen, nachdem das Ohr vorher sorgfältig rasiert und gründlich mit Alkohol und Äther gereinigt und desinfiziert worden war. Als Milz- und Knochenmarkspräparate benutzte ich Tabletten von Burroughs Welcome & Co. Jede Tablette enthielt 0,324 g Trockensubstanz. Jedes Tier erhielt täglich eine Tablette. Diese wurde zuerst in einem kleinen Mörser gut zerrieben, im Wasser gelöst und dem Tiere per os mittels einer Sonde gereicht.

Die Ergebnisse meiner Versuche teile ich in den nachfolgenden sechs Abbildungen und sechs Tabellen mit (Abb. 1 bis 6 und den Tabellen I bis VI).

Ich betrachte zunächst einmal die erste Serie der Versuche, bestehend aus dem Kontrolltier Nr. 1, bei welchem nach Blutentzug der Verlauf der Regeneration ohne weitere Beeinflussung verfolgt wurde, aus Versuchstier Nr. 1, welches nach dem Blutentzug mit Knochenmarkstabletten gefüttert wurde, und aus Versuchstier Nr. 2, das nach dem Blutentzug mit Milztabletten gefüttert wurde. Man sieht, daß beim Normaltier nach verhältnismäßig kurzer Zeit das Blut wieder zur Norm zurückkehrt. Den Verlauf beim Normaltier habe ich zum stärkeren Vergleich in die nachfolgenden Kurven eingetragen,

Tabelle I.

Kontrolltier Nr. 1 (grau) ♀. Gewicht 2440 g.

Datum	Futter	Hämoglobin	Bemerkungen
9. XII. 1926	Gewöhnlich	73	Die Hämoglobinbestimmung wurde mit dem Hämometer von *Sahli* ausgeführt
11. XII.		72	
14. XII.		73	
16. XII.		73	
18. XII.		71	
20. XII.		73	
21. XII.	Blutentzug 33 ccm (Körpergew. 2440 g)		
21. XII.	Gewöhnlich	61 83%	
22. XII.		53 72%	
24. XII.		59 80%	
27. XII.		65 89%	
30. XII.		69 94%	
3. I. 1927		73	
7. I.		72	
10. I.		73	

Abb. 1.

so daß der Tatbestand mit größter Deutlichkeit hervortritt. Es zeigt sich, daß, verglichen mit dem Kontrolltier, die Regeneration, d. h. die Rückkehr zum Normalzustand, nach Fütterung mit Knochenmarkstabletten sehr viel länger dauert. Aber noch viel länger dauert die Regeneration beim Tiere, welches mit Milztabletten gefüttert worden war. Ja Abb. 3 zeigt, daß sogar im Anfang bei der Zufuhr von Milztabletten die Regeneration überhaupt nicht eintritt; erst nach 3 bis 4 Tagen beginnt eine Zunahme der roten Blutkörperchen.

Diese Resultate waren so auffallend und standen so sehr im Widerspruch mit den Mitteilungen von *Leake*, daß ich an die erste Versuchsreihe die zweite Versuchsreihe anschloß. Einem als Kontrolltier dienenden Kaninchen wurde wiederum ein Blutentzug gemacht und

Tabelle II.

Versuchstier Nr. 1 (grau) ♀. Gewicht 2645 g.

Datum	Futter		Hämoglobin		
14. XII. 1926	Gewöhnlich		70		Die Hämoglobinbestimmung wurde mit dem Hämometer von *Sahli* ausgeführt
16. XII.			72		
18. XII.			71		
20. XII.			71		
21. XII.	Blutentzug 33 ccm (Körpergew. 2645 g)				
21. XII.	Gewöhnlich	1 Knochenmarkstablette	58	81%	Knochenmarkstabletten von Burroughs Welcome & Co., jede Tablette 0,324 g trock. Knochenmark enthaltend
22. XII.			54	76%	
23. XII.					
24. XII.			57	80%	
25. XII.					
26. XII.					
27. XII.			60	84%	
28. XII.					
29. XII.					
30. XII.			64	90%	
31. XII.					
1. I. 1927					
2. I.					
3. I.			67	94%	
4. I.					
5. I.					
6. I.			69	97%	
7. I.					
8. I.					
9. I.					
10. I.			71		
13. I.			71		
17. I.			70		

Abb. 2.

Tabelle III.

Versuchstier Nr. 2 (schwarz) ♀. Gewicht 2545 g.

Datum	Futter		Hämoglobin		Bemerkungen
14. XII. 1926	Gewöhnlich		12		Die Hämoglobinbestimmung wurde mit dem Hämometer von *Sahli* ausgeführt
16. XII.			12		
18. XII.			71		
20. XII.			72		
21. XII.	Blutentzug 31 ccm (Körpergew. 2545 g)				
21. XII.	Gewöhnlich	1 Milztablette	60	83%	Milztabletten von Burroughs Welcome & Co., jede Tablette 0,324 g trock. Schafsmilz enthaltend
22. XII.			56	77%	
23. XII.					
24. XII.			56	77%	
25. XII.					
26. XII.					
27. XII.			57	79%	
28. XII.					
29. XII.					
30. XII.			61	84%	
31. XII.					
1. I. 1927					
2. I.					
3. I.			64	88%	
4. I.					
5. I.					
6. I.			66	91%	
7. I.					
8. I.					
9. I.					
10. I.			68	94%	
11. I.					
12. I.					
13. I.			70	97%	
14. I.					
15. I.					
16. I.					
17. I.			72		
20. I.			71		
25. I.			72		

Abb. 3.

die Regeneration verfolgt. Den Verlauf dieser Regeneration zeigt die Abb. 4. Diesen normalen Regenerationsverlauf habe ich in die Abb. 5 und 6 zum Vergleich mit eingetragen. Die Abb. 5 und 6 repräsentieren

Tabelle IV.

Kontrolltier Nr. 2 (grau) ♀. Gewicht 2610 g.

Datum	Futter	Hämoglobin	Bemerkungen
15. I. 1927	Gewöhnlich	72	Die Hämoglobinbestimmung wurde mit dem Hämometer von *Sahli* ausgeführt
18. I.		73	
20. I.		72	
22. I.		73	
25. I.		73	
27. I.		73	
28. I.	Blutentzug 30 ccm (Körpergew. 2610 g)		
28. I.	Gewöhnlich	65 89%	
29. I.		63 86%	
31. I.		65 89%	
3. II.		69 94%	
5. II.		73	
8. II.		72	
11. II.		73	
14. II.		73	

Abb. 4.

die beiden Versuchstiere Nr. 3 und 4, bei denen nach dem Blutentzug gleichzeitig Knochenmarks- und Milztabletten eingegeben wurden, demnach die Versuchsanordnungen von *Leake* reproduziert worden waren. Es geht aus den kurvenmäßigen Tabellen sowie aus den Protokollen deutlich hervor, daß auch bei der Doppeldarreichung von Knochenmarks- und Milztabletten die Blutregeneration ganz wesentlich verzögert ist, und ganz deutlich sieht man, Versuch Abb. 6, daß im allerersten Anfang überhaupt keine Regeneration eintritt, während sie beim Kontrolltier sofort eintritt. Im Bilde dieser letzteren Versuchsreihe überwiegt offenbar der Einfluß der Milz.

Die von mir gefundenen Tatsachen lassen keinen anderen Schluß zu, als daß unter der Einwirkung von Knochenmark und Milz allein, sowie unter der doppelten Einwirkung der beiden Präparate die Blutregeneration verzögert ist. Bei genauem Zusehen zeigt sich, daß anscheinend der verzögernde Einfluß des Milzpräparats der größere ist. Die Tatsachen lassen jedenfalls die Deutung zu, daß in den Milzpräparaten ein Etwas ist, welches die blutbildende Funktion des Knochenmarks in irgend einer Weise hemmend beeinflußt. Somit besteht im Lichte

Tabelle V.

Versuchstier Nr. 3 (grau) ♀. Gewicht 2820 g.

Datum	Futter			Hämoglobin		Bemerkungen
20. I. 1927	Gewöhnlich			70		Die Hämoglobinbestimmung wurde mit dem Hämometer von *Sahli* ausgeführt
22. I.				71		
25. I.				70		
27. I.				70		
28. I.	Blutentzug 35 ccm (Körpergew. 2820 g)					
28. I.	Gewöhnlich	1 Knochenmarkstablette	1 Milztablette	66	94%	Knochenmarks- und Milztabletten von Burroughs Welcome & Co., jede Tablette 0,324 g trockenes Knochenmark (bzw. Schafsmilz) enthaltend
29. I.				64	91%	
30. I.						
31. I.				59	84%	
1. II.						
2. II.						
3. II.				61	87%	
4. II.						
5. II.						
6. II.						
7. II.				63	90%	
8. II.						
9. II.						
10. II.				63	90%	
11. II.						
12. II.						
13. II.						
14. II.				65	92%	
15. II.						
16. II.						
17. II.				67	95%	
18. II.						
19. II.						
20. II.						
21. II.				70		
24. II.				71		
27. II.				70		

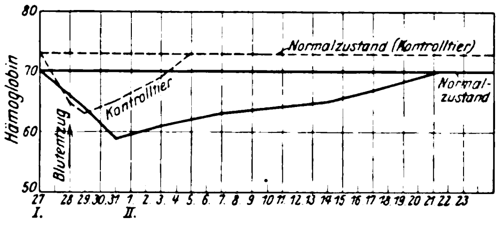


Abb. 5.

Tabelle VI.

Versuchstier Nr. 4 (schwarz) ♀. Gewicht 2630 g.

Datum	Futter			Hämoglobin		Bemerkungen
20. I. 1927	Gewöhnlich			70		Die Hämoglobinbestimmung wurde mit dem Hämometer von *Sahli* ausgeführt
22. I.				71		
25. I.				71		
27. I.				71		
28. I.	Blutentzug 30 ccm (Körpergew. 2630 g)					
28. I.	Gewöhnlich	1 Knochenmarkstablette	1 Milztablette	65	91%	Knochenmarks- und Milztabletten von Burroughs-Welcome & Co., jede Tablette 0,324 g trockenes Knochenmark (bzw. Schafsmilz) enthaltend
29. I.				58	80%	
30. I.						
31. I.				58	80%	
1. II.						
2. II.						
3. II.				60	84%	
4. II.						
5. II.						
6. II.						
7. II.				62	87%	
8. II.						
9. II.						
10. II.				65	91%	
11. II.						
12. II.						
13. II.						
14. II.				67	94%	
15. II.						
16. II.						
17. II.				70	98%	
18. II.						
19. II.				71		
24. II.				71		
27. II.				70		

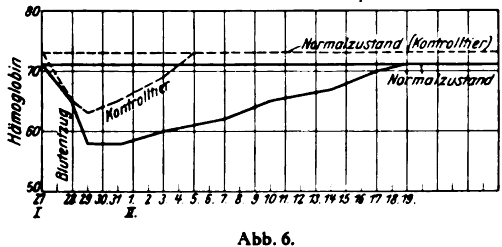


Abb. 6.

meiner Erfahrung, die im Gegensatz zu derjenigen von *Leake* steht, die von der Berner Schule vertretene Lehre zu Recht, daß die Milz einen hemmenden Einfluß auf die blutkörperchenbildende Funktion des Knochenmarks ausübt. Möglicherweise beruht der Unterschied in der Erfahrung auf dem gewählten Versuchstier. Meine Beobachtungen sind am Kaninchen gemacht worden, und am Kaninchen hat *Nakao* seine früheren entscheidenden Beweise für die hier vertretene Lehre erbracht.

Zusammengefaßt, ist der Inhalt der vorstehenden Arbeit der nachfolgende:

1. Im Vergleich zu Normaltieren regeneriert ein Kaninchen nach Blutentzug das Blut viel langsamer, wenn Milz- oder Knochenmarkspräparate oder gleichzeitig Milz- und Knochenmarkspräparate gereicht werden.

2. Die Milz scheint dabei den stärker verzögernden Einfluß auszuüben.

3. Das gewonnene Resultat besagt, daß am Kaninchen die Milz einen hemmenden Einfluß auf das Knochenmark ausüben kann, eine Lehre, die durch zahlreiche Arbeiten des Berner Physiologischen Instituts gesichert ist.

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

Nr. 112.

Untersuchungen über den Eisenstoffwechsel vor und nach Milzexstirpation bei Tieren mit gut ausgebildeter Überkompensation.

Von

Fritz Neuenschwander.

[Aus dem Physiologischen Institut (Hallerianum) der Universität Bern.]

(Eingegangen am 26. September 1927.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Einleitung.

Die Beziehungen zwischen Milz und Eisenstoffwechsel sind, nachdem durch die *Asher*sche Schule deren Untersuchung vermittelst exakter Eisenstoffwechselversuche gemacht worden ist, mehrmals bearbeitet worden. Die erhaltenen Resultate sind nicht einheitlicher Natur. Es sind folgende Beziehungen beobachtet worden:

In einer Reihe von Arbeiten wurde eine Steigerung der Eisenausscheidung der Milz gefunden, und es wurden auch die Bedingungen klargelegt, von denen die Vermehrung der Eisenausscheidung nach Entmilzung abhängen sollten. Auf diesen Tatsachen gründete sich in erster Linie, aber nicht ausschließlich, die Lehre von der Rolle der Milz für den Eisenstoffwechsel. Sie braucht sich deshalb nicht ausschließlich auf die Eisenstoffwechselversuche zu stützen, weil es auch andere Arten der Untersuchung des Eisenstoffwechsels gibt, z. B. diejenigen von *Chevallier*[1], aus denen gleichfalls die Beteiligung der Milz am Eisen-

[1] *Chevallier*, Presse méd. **31**, 691, 1923; Arch. f. pathol. Anat. u. Phys. **217**, 358, 1914.



stoffwechsel hervorgeht. Einige Arbeiten finden zwar auch eine Vermehrung der Eisenausscheidung nach der Entmilzung. Sie beziehen dieselbe nicht nur auf den Ausfall bei einer eisenregulierenden Milzfunktion, sondern auch auf sekundäre Folgen der Milzexstirpation. Insbesondere gilt dies von der Ratte, bei welcher nach *Lauda*[1] eine perniziöse und infektiöse Anämie vorkommen soll. Andere Arbeiten wiederum, darunter auch einige aus dem bernischen physiologischen Institut, finden nach der Entmilzung keine wesentliche Veränderung im Eisenstoffwechsel. Nur ein einziger Autor, *Irger*[2], findet eine ungewöhnlich große Verminderung Eisenausscheidung nach der Entmilzung.

Wenn wir von der letztgenannten Arbeit absehen, so sind die Widersprüche nicht so große, als es den Anschein hat. Im Vordergrunde der Physiologie der Milz steht die immer noch nicht hinreichend gewürdigte Tatsache der außergewöhnlich großen Kompensationsfähigkeit, über welche der Organismus gerade hinsichtlich der Milz verfügt. Eine sehr große Reihe von Arbeiten aus dem bernischen physiologischen Institut hat die Kompensation bei Ausfall der Milz exakt bewiesen. Zuletzt hat dies *Scheinfinkel*[3] gezeigt. Auch wird vom morphologischen Standpunkt aus die Lehre von der Kompensation der Milzfunktion leicht verständlich, wenn man sich der *Aschoff*schen Lehre vom reticuloendothelialen System, von dem die Milz nur ein Teil ist, anschließt. Wir wollen also von dem Standpunkt ausgehen, daß eine Steigerung des Eisenstoffwechsels nicht einzutreten braucht, wenn es sich um einen Organismus handelt, der sehr rasch die ausfallende Milz für den Eisenstoffwechsel kompensieren kann. Einen solchen Organismus kennen wir jetzt genau aus der vorher genannten Arbeit von *Scheinfinkel*.

Scheinfinkel zeigte nämlich, daß beim Meerschweinchen schon 3 Tage nach Milzexstirpation der Eisengehalt der Leber gegenüber der Norm um 60% gesteigert war. Bedenkt man nun die Größe der Leber, so geht aus diesem Zahlenverhältnis klar hervor, daß nicht bloß eine Kompensation, sondern vermutlich auch eine Überkompensation stattgefunden hat, wie wir dieselbe auch auf anderen biologischen Gebieten kennen. Auch werden Meerschweinchen nach Milzexstirpation nicht anämisch, was sich ja vorzüglich aus der nachgewiesenen Kompensation durch die Leber erklärt.

[1] *E. Lauda*, Klin. Wochenschr. **4**, 1587, 1925; Wien. Arch. f. inn. Med. **11**, 293, 1925; Virchows Arch. **258**, 529, 1925.

[2] *Irger*, diese Zeitschr. **169**, 417, 1926.

[3] *Scheinfinkel*, ebendaselbst **176**, 348, 1926.



Der geschilderte Tatbestand war die Ursache, daß ich auf Anregung von Prof. *Asher* den Eisenstoffwechsel des Meerschweinchens, als Typus gut und rasch kompensierender Tiere, vor und nach der Milzexstirpation untersuchte. Der Gedankengang der Arbeit war der, daß bei dieser Art Tiere voraussichtlich die Entfernung der Milz nicht zu einer gesteigerten Eisenausscheidung führen würde. Dazu kam noch die Kenntnis, daß diese Tiere nach den bisherigen Erfahrungen des bernischen physiologischen Instituts nach der Milzexstirpation nicht anämisch werden. Ob diese Voraussetzungen zutreffen, mußte allerdings die experimentelle Untersuchung entscheiden.

Methodik.

Der erste Teil meiner Arbeit beschäftigte sich mit dem Eisenstoffwechsel von normalen Meerschweinchen. Ist schon die Untersuchung des Eisenstoffwechsels von größeren Lebewesen, wie Menschen und Hund, mit erheblichen Schwierigkeiten behaftet, um so mehr an so kleinen Tieren wie Meerschweinchen, über deren Eisenstoffwechsel, soweit die Literatur zugängig ist, keine Stoffwechseluntersuchungen vorliegen. Derartige Untersuchungen sind möglich geworden, seitdem man die theoretisch gut begründete, bei exakter Ausführung zuverlässig arbeitende Methode von *Kugelmass*[1] besitzt. Diese erwies sich in den Händen von *Tominaga*[2] und *Scheinfinkel* gerade für Stoffwechseluntersuchungen sehr brauchbar. Im wesentlichen verfolgte ich die Methodik der Eisenstoffwechseluntersuchungen, wie sie in den beiden genannten Arbeiten beschrieben ist. Daher werde ich an dieser Stelle nur die geringen Modifikationen beschreiben, die ich im Laufe der Arbeit als nützlich gefunden habe.

1. Das Trocknen des Kotes geschah in einer Porzellanschale ohne vorherige, von *Nakayama*[3] angegebene Hinzufügung von destilliertem Wasser und etwas reinster Schwefelsäure. Durch Anwendung beider Methoden habe ich herausgefunden, daß meine Modifikation viel weniger zeitraubend ist und nichts zu wünschen übrig läßt, was die Genauigkeit der Analyse anbelangt.

2. Das Zentrifugieren nach Hinzufügung von Rhodanammonium erachte ich als unnötig. Hauptsache ist ein gutes Schütteln, damit sämtliches Eisen von Isoamylalkohol festgehalten wird. Die Resultate mit Zentrifugieren und ohne Zentrifugieren stimmten vollständig überein, so daß auch diese Modifikation wegen Zeitersparnis zu empfehlen ist.

Die größte Schwierigkeit lag aber in der technischen Anordnung der Aufbewahrung der Tiere, der Ernährung derselben und dem quantitativen Auffangen des Kotes. Das Allerwesentlichste war bei Anwendung einer subtilen Mikromethode die Verhütung des Hineinkommens kleinster Mengen von Eisen aus dem Stoffwechselkäfig. Aus diesem Grunde mußten neue Stoffwechselkäfige für diese Zwecke konstruiert werden. Die Kon-

[1] *M. J. Kugelmass*, Extrait du bull. de la Soc. de Chim. Biol. 4, 1577, 1922.

[2] *Y. Tominaga*, diese Zeitschr. 156, 418, 1925.

[3] *Nakayama*, ebendaselbst 151, 120, 1924.

struktion, welche sich als brauchbar erwies und die meines Erachtens eine Verunreinigung mit Eisen ausschloß, war die nachfolgende:

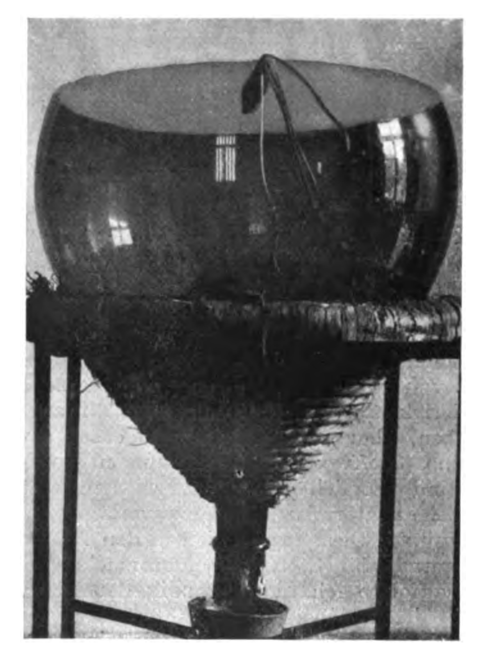


Abb. 1.

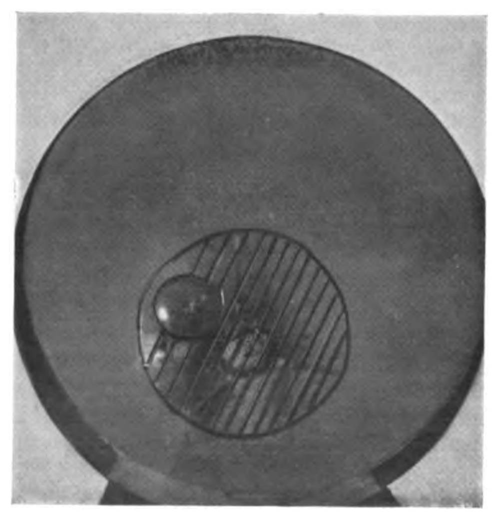


Abb. 2.

Hauptbestandteil des Käfigs ist eine umgekehrte Glasflasche, deren Boden abgesprengt wurde. In diese Flasche kommt als erstes eine fein-

gelochte Porzellanplatte von etwa 7 cm Durchmesser. Darauf wird ein aus purem Glas von mir entworfenes Gestell, sogenannter „Rost“, gestellt (nähere Beschreibung siehe nachfolgende Zeichnung), worauf die Tiere gesetzt werden. Den Abschluß des Käfigs nach oben bildet ein Deckel aus Holz, der eine Verunreinigung aus der Umgebung verhindert. Durch diese Konstruktion ist eine Verunreinigung mit Eisen total ausgeschlossen, und

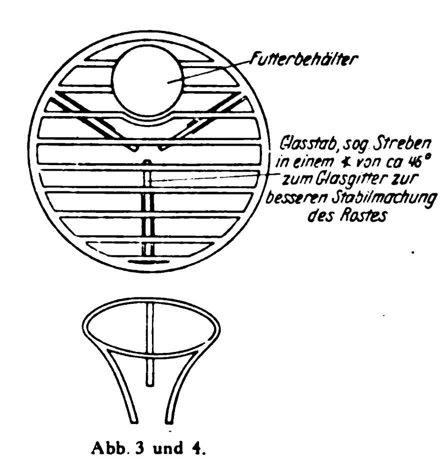


Abb. 3 und 4.

der Käfig ist für ein Meerschweinchen von etwa 500 bis 1000 g Gewicht solid genug gebaut, so daß sich das Tier ohne Gefahr viele Tage lang darin bewegen kann. Der Kot fällt durch das Gitter auf die Porzellanplatte und kann dort aufgefangen und sofort zur Analyse verwendet werden. Der Harn fließt durch die feingelochte Platte in einen unter den Käfig gestellten Behälter. Zur besseren Illustration machte ich photographische Aufnahmen (s. Abb. 1 und 2).

Ich möchte diese Käfige als *Präzisionsstoffwechselkäfige* für *Mineralstoffwechsel* bezeichnen.

Die weitere Schwierigkeit, die zu überwinden war, war die Ernährung der Tiere. Bekanntlich sind Meerschweinchen sehr diffizil ihrer Nahrung gegenüber, es gelingt nicht, wie bei anderen Tieren, eine beliebige Nahrung aufzuzwingen, vorausgesetzt, daß man sie in gutem Zustande behalten will. Namentlich ist es schwierig, ihnen die eisenfreie Nahrung aufzuzwingen, welche beim Hunde verhältnismäßig lange ertragen wird. Bei dieser ersten Arbeit über den Eisenstoffwechsel des Meerschweinchens mußte ich auf eisenfreie Nahrung verzichten, und, was ein schwacher Punkt bei dieser Arbeit ist, eine verhältnismäßig arme Nahrung den Tieren reichen. Ich habe versucht, Vorkehrungen zu treffen, daß der Umstand, daß die Nahrung möglichst eisenfrei sein sollte, kompensiert würde durch möglichste Konstanterhaltung der Nahrung, so daß alle Vergleiche unter annähernd denselben Bedingungen stattfanden. Es folgt nun die Beschreibung der Nahrung, deren Menge und Gehalt an Eisen und das Auffangen des Kotes im Käfig.

Die Nahrung bestand aus:

1. etwa 40 g roten Rüben = 0,4044 mg Eisen,
2. „ 30 g Hafer = 0,7205 „ „ und etwas Heu.

Der Hafer befand sich in dem von mir vorher beschriebenen gläsernen Behälter, der mit dem Glasrost verschmolzen wurde. Die Rüben legte ich auf den Rost selber und zweimal täglich nahm ich die Tiere aus dem Käfig, um sie in einem eisenfreien Behälter noch mit etwas Heu zu füttern. Der darin entstandene Kot wurde sorgfältig gereinigt und in den Stoffwechselkäfig zurückgetan, so daß nichts davon verloren ging. Der auf der Porzellanplatte befindliche Kot wurde mittels einer hölzernen Pinzette herausgenommen und von zufällig heruntergefallenen Haferkörnern und kleinen Rübenteilchen befreit und vollständig gereinigt auf das Dauerbad gesetzt.

Erster Teil.

Im Anfang, als ich noch die Versuche mit eisenfreier Nahrung machte, die ich aber abbrechen mußte, weil die Tiere zugrunde gingen, konnten recht beachtenswerte Erfahrungen bei diesen Tieren gemacht werden. Es zeigte sich nämlich eine abnorm große Eisenausscheidung, die sich mit der Verschlechterung des Zustandes der Tiere erhöhte. Diese Tatsache geht aus den nachfolgenden Protokollen hervor.

Tabelle I.

Datum 1927	Getrocknete Kotmenge g	Gefundene Eisenmenge mg	Eisenmenge pro Tag und Tier mg	Mittelwert mg	Eisenmenge pro Tag und kg mg	Mittelwert mg	Körpergewicht g	Bemerkungen
Meerschweinchen Nr. 1, ♂. Vor der Entmilzung.								
4.—5. V.	1,270	0,1714	0,0857	—	0,3895	—	220	Von Anfang mit eisenarmer Nahrung gefüttert
6. V.	1,240	0,1612	0,1612	—	0,7328	—	—	
7.—8. V.	1,320	0,2508	0,1254	**0,2462**	0,5700	**1,2702**	—	
9. V.	0,957	0,4400	0,4400	—	2,2000	—	200	
10. V.	1,745	0,4188	0,4188	—	2,4587	—	170	Große Gewichtsabnahme
12. V.	†. Sektion zeigt keine sichere Todesursache							
Meerschweinchen Nr. 2, ♂. Vor der Entmilzung.								
5.—8. V.	1,145	0,2175	0,0543	—	0,2585	—	210	Von Anfang mit eisenarmer Nahrung gefüttert
9. V.	0,430	0,0860	0,0860	—	0,4095	—	—	
10. V.	0,658	0,3421	0,3421	—	1,7538	—	195	
11. V.	0,747	0,3884	0,3884	**0,3159**	1,9918	**1,7358**	—	
12. V.	0,753	0,4066	0,4066	—	2,2589	—	180	
13. V.	0,877	0,5612	0,5612	—	3,1166	—	—	
14.—15. V.	1,185	0,7465	0,3732	—	2,3620	—	158	
20. V.	—	—	—	—	—	—	—	Operation
21. V.	†. Sektion zeigt keine sichere Todesursache							

Die Erklärung für die vergrößerte Eisenausscheidung bei diesen Tieren ist keine ganz einfache. Es liegt kein Anhaltspunkt dafür vor, daß es sich um eine Form der Anämie handelt, bei der täglich eine große Menge roter Blutkörperchen zugrunde gehen. In erster Linie scheint mir an die schon von *Großenbacher*[1] und *Zimmermann*[2] vertretene Auffassung angeknüpft werden zu müssen, daß gesteigerter Zellzerfall von einer vermehrten Eisenausscheidung begleitet ist, selbst dann, wenn die Milz im Organismus vorhanden ist.

Meine Hauptversuche sind an drei Tieren, die in vollständigem Wohlbefinden untersucht wurden, gemacht worden. Die Tiere hatten ein Körpergewicht von: Nr. 3 = 504 g, Nr. 4 = 510 g und Nr. 5 = 390 g. Bei diesen drei Tieren habe ich zuerst den normalen Eisenstoffwechsel untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchungen gebe ich in den nachfolgenden Tabellen.

Tabelle II.

Datum 1927	Getrocknete Kotmenge g	Gefundene Eisenmenge mg	Eisenmenge pro Tag und Tier mg	Mittelwert mg	Eisenmenge pro Tag und kg mg	Mittelwert mg	Körpergewicht g
			Meerschweinchen Nr. 3, ♂. Vor der Entmilzung.				
24. V.	1 320	0,8976	0,8976	—	1,7809	—	504
25.—26. V.	7,900	3,1600	1,5800	—	3,1349	—	—
27. V.	8,045	1,7296	1,7296	—	3,4317	—	—
28.—29. V.	14,394	2,3030	1,1515	**1,4321**	2,2847	**2,8415**	505
30. V.	6,810	1,3060	1,3060	—	2,5912	—	—
31. V.	8,570	1,9282	1,9282	—	3,8259	—	504
1. VI.				Operation			
			Nach Entmilzung.				
2. VI.	5,795	1,4777	1,4777	—	3,1229	—	473
3. VI.	5,835	1,0503	1,0503	—	2,2226	—	—
4.—5. VI.	14,000	2,5000	1,2500	—	2,6541	—	—
6. VI.	8,100	1,2555	1,2555	**1,2382**	2,6533	**2,5784**	—
7. VI.	7,461	1,1564	1,1564	—	2,3649	—	489
8. VI.	9,408	1,3212	1,3212	—	2,7018	—	—
9. VI.	7,784	1,1604	1,1604	—	2,3728	—	487
10. VI.	6,498	1,2346	1,2346	—	2,5351	—	—

[1] *Grossenbacher*, diese Zeitschr. **17**, 78, 1909.
[2] *Zimmermann*, ebendaselbst **17**, 297, 1909.

Tabelle III.

Datum 1927	Getrocknete Kotmenge g	Gefundene Eisenmenge mg	Eisenmenge pro Tag und Tier mg	Mittelwert mg	Eisenmenge pro Tag und kg mg	Mittelwert mg	Körpergewicht g	Bemerkungen
			Meerschweinchen Nr. 4, ♂. Vor der Entmilzung.					
25.—26. V.	8,600	1,9918	0,9950	—	1,9509	—	510	
27. V.	6,965	1,7402	1,7402	—	3,4117	—	—	
28.—29. V.	10,698	1,5512	0,7756	—	1,5408	—	490	
30. V.	8,093	1,3758	1,3758	**1,2339**	2,7795	**2,4977**	—	
31. V.	7,309	1,4983	1,4983	—	3,1149	—	481	
1. VI.	6,593	1,3168	1,3168	—	2,7336	—	—	
2. VI.	4,630	0,9360	0,9360	—	1,9480	—	—	
			Nach Entmilzung.					
4.—5. VI.	7,493	1,7580	0,8790	—	1,8087	—	—	
6. VI.	5,900	1,1800	1,1800	—	2,6517	—	445	
7. VI.	5,296	0,8208	0,8208	—	1,8427	—	—	
8. VI.	5,310	0,9292	0,9292	**1,0239**	2,0880	**2,2571**	—	
9. VI.	4,505	0,9911	0,9911	—	2,1735	—	456	
10. VI.	5,223	1,0183	1,0183	—	2,2331	—	—	
13. VI.	5,865	1,3489	1,3489	—	3,0089	—	448	
15. VI.	—	—	—	—	—	—	—	Hämoglobin 77

Es zeigt sich, daß die durchschnittliche Eisenausscheidung folgende war: Beim ersten Tier *1,4321 mg* pro die = *2,8415 mg* pro Kilogramm Körpergewicht gerechnet. Die analogen Zahlen bei den anderen Meerschweinchen sind: Zweites Tier *1,2339 = 2,4977 mg*; drittes Tier *1,0070 = 2,8776 mg*. Die durchschnittliche Eisenausscheidung ist also annähernd konstant.

Es ist nicht ohne Interesse, diese Zahlen mit den an anderen Lebewesen gewonnenen Erfahrungen der Eisenausscheidung zu vergleichen. Beim Menschen sind je nach der Ernährung die in Kot ausgeschiedenen Eisenmengen wechselnd. So fand *v. Wendt*[1] bei täglicher Einnahme von 8 mg Eisen 8 mg Eisen im Kot. Bei Aufnahme von 111 mg Eisen in der Nahrung 48 mg im Kot. In Versuchen am Hund von *Grossenbacher* und *Zimmermann* wurden

[1] Skandinavisches Handb. f. Physiol. **17**, 287, 1905.

Tabelle IV.

Datum 1927	Getrocknete Kotmenge g	Gefundene Eisenmenge mg	Eisenmenge pro Tag und Tier mg	Mittelwert mg	Eisenmenge pro Tag und kg mg	Mittelwert mg	Körpergewicht g	Bemerkungen
			Meerschweinchen Nr. 5, ♂. Vor der Entmilzung.					
25.–26. V.	4,660	1,4912	0,7456	—	1,9117	—	390	
27. V.	6,985	1,5367	1,5367	—	3,9384	—	—	
28.–29. V.	7,025	1,5102	0,7551	—	2,0353	—	371	
30. V.	4,080	1,2240	1,2240	—	3,2991	—	—	
31. V.	5,228	1,2808	1,2808	—	3,8233	—	335	
1. VI.	2,576	0,5904	0,5904	**1,0070**	1,7624	**2,8776**	—	
2. VI.	4,890	1,4670	1,4670	—	4,3791	—	—	
3. VI.	3,885	0,6604	0,6604	—	1,8447	—	358	
4.–5. VI.	9,201	1,7540	0,8770	—	2,4497	—	—	
6. VI.	5,743	1,0624	1,0624	—	2,9676	—	—	
7. VI.	4,621	0,8779	0,8779	—	2,3727	—	370	
11. VI.			Operation					
			Nach Entmilzung.					
12. VI.	1,905	1,5811	1,5811	—	4,3319	—	365	
13. VI.	6,182	2,3491	2,3491	—	6,5253	—	—	
14. VI.	4,970	1,3419	1,3419	**1,5608**	3,7483	**4,2735**	358	
15. VI.	6,920	1,5570	1,5570	—	4,3491	—	—	Hämoglobin 75
16. VI.	6,700	1,4070	1,4070	—	3,7026	—	380	
17. VI.	6,641	1,1289	1,1289	—	2,9840	—	—	

durchschnittlich 9,3 mg Eisen gefunden. Im Vergleich hierzu ist, auf das Körpergewicht berechnet, die Eisenausscheidung beim Meerschweinchen eine recht erhebliche. In Betracht zu ziehen ist hierbei, daß es sich um einen Pflanzenfresser handelt. Nachdem ich bei obengenannter Ernährung genügende Erfahrungen gesammelt hatte, versuchte ich, beim dritten Tiere während kurzer Zeit eine eisenarme Nahrung zu geben. Sie bestand in 40 g roten Rüben. Eine Beschreibung und Tabelle folgt später.

Ich schritt jetzt zur Exstirpation der Milz. Sie geschah in längst bekannter Weise möglichst aseptisch und ohne Blutverlust. Alle Tiere heilten per primam, und nach einem Tage konnten sie zur weiteren Untersuchung gebracht werden.

Die Ergebnisse des Eisenstoffwechsels nach der Milzexstirpation.

Meine Erfahrungen an den drei von mir benutzten Tieren lassen sich in zwei voneinander verschiedene Gruppen einteilen. Die eine besteht aus den Tieren Nr. 3 und 4, während die andere Gruppe vom Tier Nr. 5 gebildet wird. Ich verweise auf die betreffenden Ergebnisse in den früheren Tabellen II, III und IV. Was das Meerschweinchen Nr. 3 anbelangt, so hat es im Durchschnitt vor der Entmilzung 1,4321 mg Eisen ausgeschieden. Nach der Entmilzung betrug der durchschnittliche Wert der Eisenausscheidung im Kot 1,2382 mg. Es handelt sich demnach um eine kleine Abnahme der Eisenausscheidung. Berechnet man dieselbe pro Kilo Körpergewicht, so zeigt sich eine Ausscheidung von 2,84 mg im Durchschnitt und nach der Entmilzung 2,58 mg. Die Unterschiede sind nicht so groß, daß man nicht davon sprechen könnte, daß praktisch die Eisenausscheidung vor und nach der Entmilzung bei diesen beiden Tieren annähernd gleich sind. Anders ist das Verhalten des Tieres Nr. 5. Bei diesem Tiere beträgt die durchschnittliche Eisenausscheidung 1,0070 mg. Nach der Entmilzung ist die tägliche Eisenausscheidung deutlich größer. Jeder einzelne Tag zeigt höhere Eisenwerte als vor der Entmilzung, und zwar beträgt diese Zahl *1,5608* bzw. *4,2735 mg*.

Bei diesem Tiere läge eine Bestätigung derjenigen Befunde vor, wo die Entfernung der Milz zu einer gesteigerten Eisenausscheidung führt. Dieses Versuchstier wäre eine Bestätigung der Lehre von dem Anteil der Milz am Eisenstoffwechsel, beurteilt nach der Eisenausscheidung im Kot. Da aber, ganz abgesehen von den Erfahrungen anderer Autoren, ich bei den anderen Tieren die Steigerung nicht gefunden, sondern eine, wenn auch geringe Verminderung beobachtet habe, so mußte untersucht werden, ob nicht bei diesem Versuchstier Bedingungen vorhanden seien, welche die vermehrte Eisenausscheidung veranlaßten, ohne daß dieselben eine unmittelbare Folge des Anteils der Milz am Eisenstoffwechsel wäre. In erster Linie mußte untersucht werden, ob nicht dieses Versuchstier, verglichen mit einem anderen, infolge einer größeren Zerstörung von roten Blutkörperchen anämisch sei. Um diese Frage zu entscheiden, habe ich bei Meerschweinchen Nr. 4 und 5, welch letzteres der ersten Gruppe angehört, mit Hilfe von *Sahlis* Hämoglobinometer das Hämoglobin bestimmt. Es ergab sich bei Meerschweinchen Nr. 5 ein Hämoglobingehalt von 75 und bei Meerschweinchen Nr. 4 von 77. Beide sind normal und daher liegt erstens kein Unterschied im Hämoglobingehalt der beiden in bezug auf Eisenausscheidung verschiedenen Tiere vor, noch ist zweitens überhaupt eine Anämie infolge der Milzexstirpation aufgetreten. Diese für Meerschweinchen gültige Tatsache hat schon *Scheinfinkel* hervorgehoben.

Meerschweinchen Nr. 5 war im gleichen Wohlbefinden wie Nr. 3 und 4 und erhielt sich, wie aus dem Gleichbleiben des Körpergewichtes hervorgeht, sehr gut. Die Nahrung war die gleiche.

Aus allen diesen Gründen glaube ich, daß die plausibelste Erklärung für die gesteigerte Eisenausscheidung in diesem Falle das Fehlen der Milz sei. Dieser Schluß gilt vorerst natürlich nur für die Dauer meiner Beobachtungsperiode.

Aber auch das Verhalten der Eisenausscheidung bei den anderen Tieren läßt sich natürlich und zwanglos erklären, ohne daß ein Widerspruch mit der Lehre entsteht, daß die Milz einen Anteil an der Regulation des Eisenstoffwechsels habe. Der Ausgangspunkt meiner Arbeit war diese Feststellung der außerordentlichen Raschheit, mit welcher gerade Meerschweinchen den Ausfall der eisenregulierenden Milzfunktion zeigen, denn der Eisengehalt der Leber hat sich schon am dritten Tage nach der Milzexstirpation um 60% vermehrt. Dieser Sachverhalt lehrt nicht bloß die rasche und vollständige Kompensationsmöglichkeit durch die Leber, sondern weist auch auf eine Überkompensation hin. Hierauf fußend, wird man sogar eine verminderte Eisenausscheidung nicht als unerwartet bezeichnen können, vielmehr erblickt man in ihr den Ausdruck der Überkompensation. In diesem Sinne sind auch diese Erfahrungen durchaus im Einklang mit der Lehre vom Anteil der Milz an der Regulation des Eisenstoffwechsels und ihrem Zusammenhang mit der bei Ausfall der Milz geweckten Kompensation. Da der Umfang von Tier zu Tier und erst recht von Tierart zu Tierart verschieden ist, wird auch die Größe des Eisenstoffwechsels nach Entmilzung, ohne besondere Vorkehrungen, von Fall zu Fall wechselnd sein.

Ich habe eine kleine Anzahl von Versuchen angestellt, bei denen ich, um den Eiweißgehalt der Nahrung herabzusetzen, den Hafer weggelassen habe. Das Ergebnis teile ich in der folgenden Tabelle mit.

Es zeigt sich eine gewisse Verminderung der Eisenausscheidung. Sie dürfte wohl damit zusammenhängen, daß mit dem Weglassen des Hafers zwar die Eiweißmenge der Nahrung herabgesetzt wird, gleichzeitig aber auch die Eisenmenge. Bei überkompensierten Tieren wird anfänglich die Verminderung des Eisengehaltes der Nahrung erst recht zu einer Zurückhaltung des Eisens führen.

Ich habe, um ein Urteil über den Eisengehalt der von mir gereichten Nahrung zu gewinnen, den Eisengehalt des Hafers und der Rüben bestimmt. Die von mir gefundenen Werte für Rüben und Hafer sind: *0,4044 mg* Eisen pro 40 g Rüben bzw. *0,7205 mg* pro 30 g Hafer. Da dies gerade die Mengen von Nahrung sind, die ich den Tieren täglich reichte, so berechnet sich die täglich eingenommene Menge Eisen auf 1,1249 mg. Dieser Wert ist ein verhältnismäßig geringer und bewegt

Tabelle V.

Datum 1927	Getrocknete Kotmenge g	Gefundene Eisenmenge mg	Eisenmenge pro Tag und Tier mg	Mittelwert mg	Eisenmenge pro Tag und kg mg	Mittelwert mg	Körpergewicht g	Bemerkungen
			Meerschweinchen Nr. 5, ♂. Vor der Entmilzung.					
8. VI.	5,565	1,0573	1,0573	—	2,8575	—	—	Fütterung mit 40 g Rüben, etwas Heu, *ohne* Hafer
9. VI.	4,225	0,7605	0,7605	0,9077	1,8858	2,3297	403	
10. VI.	3,292	0,9053	0,9053	—	2,2464	—	—	
			Meerschweinchen Nr. 4. Nach Entmilzung.					
14. VI.	2,657	0,7971	0,7971	—	1,7519	—	455	Fütterung mit 50 g Rüben, etwas Heu, *ohne* Hafer
15. VI.	2,138	0,7055	0,7055	0,7640	1,5505	1,6716	—	
16. VI.	2,429	0,7895	0,7895	—	1,7125	—	461	

sich in den Grenzen der täglichen Eisenbedürfnisse der Tiere. Auf Grund dieser Bestimmung scheint mir der Beweis erbracht zu sein, daß der Eisengehalt der gereichten Nahrung kaum von Einfluß auf die gefundenen Unterschiede in der Eisenausscheidung vor und nach der Entmilzung gewesen sein kann, was schon daraus hervorgeht, daß die Resultate bei verschiedenen Tieren etwas in entgegengesetzter Richtung liegen.

Zusammengefaßt, ist der wesentliche Inhalt der vorstehenden Arbeit der nachfolgende:

1. Es wurde eine neue Methode ausgearbeitet, um an kleinen Versuchstieren vom Typus Meerschweinchen exakte Eisenstoffwechselversuche auszuführen.

2. Die tägliche Eisenausscheidung der Meerschweinchen, die mit den gerade hinreichenden Mengen von Hafer und Rüben gefüttert wurden und sich vollständig wohl befanden, betrug:

Meerschweinchen Nr. 3 . . 1,4321 mg
,, ,, 4 . . 1,2339 ,,
,, ,, 5 . . 1,0070 ,,

3. Bei Tieren, die in einen ungünstigen Zustand geraten, nimmt die Eisenausscheidung zu.

4. Die Exstirpation der Milz führt entweder zu einer kleinen Verminderung der Eisenausscheidung oder zu einer Vermehrung derselben.



5. Die Vermehrung der Ausscheidung beruht nicht auf der nachweislich nicht vorhandenen Anämie, sondern auf dem Fortfall der Milz.

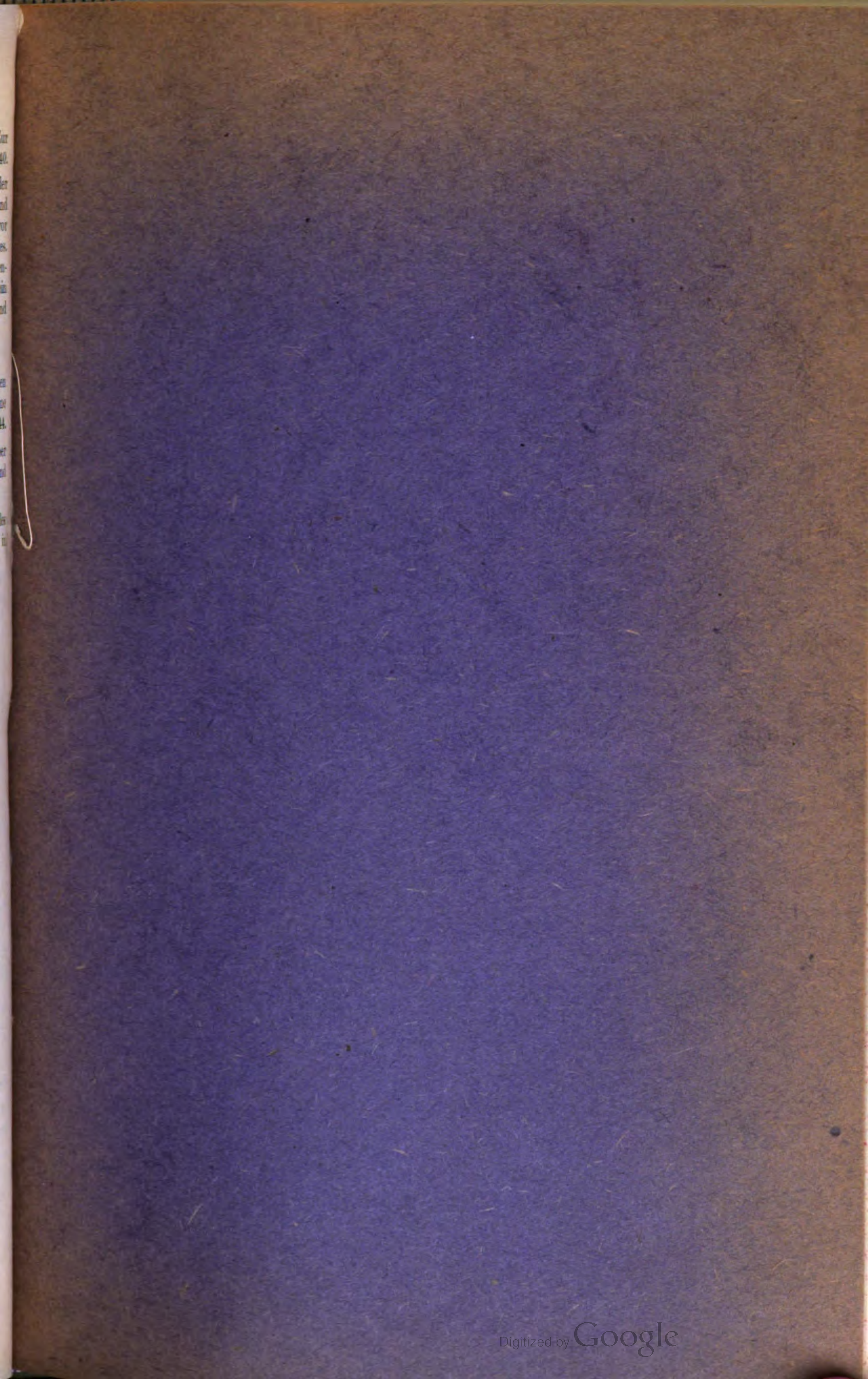
6. Die geringfügige Verminderung der Eisenausscheidung beruht auf der früher nachgewiesenen Überkompensation des Milzausfalles durch die Leber bei Meerschweinchen.

7. Die in Nr. 5 und 6 enthaltenen Konstatierungen bestätigen die Lehre von dem Anteil der Milz am Eisenstoffwechsel, und die Notwendigkeit, die von Tier zu Tier verschiedene Kompensation bzw. Überkompensation zu berücksichtigen.

Berichtigung.

In der Arbeit von *P. J. Jurišić*, Untersuchungen über die Bedeutung der ζ-Potentiale für elektroosmotische Flüssigkeitsüberführung durch Kollodiummembranen, Bd. 189, Heft 4/6, muß es auf S. 295 statt $v = \frac{q \zeta E D}{4 \pi \eta}$ $v = \frac{q \zeta E D}{4 \pi \eta l}$ heißen, wobei l den Abstand der Elektroden bedeutet.

Autorenverzeichnis.





B I O C H E M I S C H E   Z E I T S C H R I F T

herausgegeben von

C. NEUBERG - BERLIN

191 Band

BERLIN

Verlag von Julius Springer

1927



B I O C H E M I S C H E   Z E I T S C H R I F T

herausgegeben von

C. NEUBERG - BERLIN

191 Band

BERLIN

Verlag von Julius Springer

1927

INHALT

Beitrag zur Frage der kindlichen Kreatinurie und ihrer Abhängigkeit von der Schilddrüse.

Von

Alexander Palladin und **Elene Ssawron.**

(Aus dem Ukrainischen Biochemischen Institut in Charkow.)

(Eingegangen am 27. September 1927.)

Es ist heute bekannt, daß bei erwachsenen Tieren und Menschen bei kreatinfreier Nahrung im Urin bloß Kreatinin enthalten ist; das Auftreten von Kreatin im Harn ist aber stets auf irgendwelche pathologische Ursachen zurückzuführen, die die Prozesse der Kreatinbildung über die Grenzen der Norm hinausführen, oder aber auf die Anwesenheit von Kreatin in der Nahrung.

Anders verhält es sich mit noch im Wachstum begriffenen Tieren. Bei ihnen wird bis zu einem gewissen Alter neben dem Kreatinin stets auch Kreatin endogener Herkunft ausgeschieden, d. h. bei ihnen besteht eine physiologische „kindliche" Kreatinurie ungeachtet des vollkommenen Mangels von Kreatin in der Nahrung.

Man kam nicht auf einmal zu der Erkenntnis, daß das Kreatin ein normaler Bestandteil des Harns junger Tiere und Kinder ist. Noch vor nicht langem meinten einige Autoren, daß die Kreatinurie bei Kindern stets auf irgendwelche pathologische Ursachen zurückgeführt werden müsse.

Auf eine beständige Ausscheidung von Kreatin bei Säuglingen und älteren Kindern wiesen *Rietschel*, *Amberg* und *Morril*, *Funaro*, *Sedgwick*, *van Hoogenhuyze* und *Doerchatt* und *Rose* hin. Einige dieser Angaben wurden mit der alten Methodik erhalten, in anderen Untersuchungen dagegen, z. B. in denen von *Rose*, war der Charakter der Nahrung der Kinder unbekannt, was ihre Beweiskraft natürlich herabsetzte. *Mc. Crudden* und *Wolf* bemühten sich auch, die Resultate der Untersuchungen von *Rose* durch die Anwesenheit von Kreatin in der Nahrung der Kinder zu erklären, indem sie zusammen mit *Schwarz* der Meinung waren, daß bei gesunden Kindern im Alter von 1 bis 15 Jahren nur Kreatinin zur Ausscheidung käme.

Sorgfältige Untersuchungen in betreff dieser Frage wurden später von *Folin* und *Denis* angestellt, und sie kamen zu dem Schlusse, daß der Harn von Kindern Kreatin auch in dem Falle enthält, wenn sie mit kreatinfreier Nahrung ernährt werden.

Zu dem gleichen Resultat gelangte auch *Krause*, welcher fand, daß die physiologische Kreatinurie bei Knaben bis zu 5 bis 6 Jahren und bei Mädchen länger dauerte. Analoge Resultate erhielten auch *Powis* und

Raper. Nach diesen Arbeiten konnte man das Vorkommen einer physiologischen, endogenen Kreatinurie bei Kindern vor dem 5. und 6. Jahre als festgestellt betrachten.

Weniger Untersuchungen liegen hinsichtlich der Tiere vor. *Closson* fand, daß junge Hunde und Katzen Kreatin auch bei kreatinfreier Nahrung ausscheiden. *Mc Collum* und *Steenbock* zeigten, daß im Harn von Ferkeln auch bei kreatinfreier Nahrung Kreatin vorkommen könne. Dasselbe fand auch eine von uns (*E. Ssawron*[1]).

Mit Rücksicht auf die geringe Anzahl der Versuche, welche die Kreatinausscheidung bei jungen Tieren feststellen, unternahmen wir es, die Ausscheidung des Kreatins bei jungen Meerschweinchen und weißen Ratten zu untersuchen[2].

I. Versuche mit jungen Meerschweinchen und weißen Ratten.

Für die Versuche mit Meerschweinchen wurden erwachsene, 12 Monate alte Tiere und junge (noch nicht ausgewachsene), eines Alters von 1 bis 8 Monaten, genommen. Sowohl die jungen wie die erwachsenen Meerschweinchen wurden mit Brot und Heu gefüttert. der Harn wurde auf den Gehalt an Gesamtstickstoff, Kreatin und Kreatinin untersucht.

In den Tabellen I und II sind beispielshalber je ein Versuchsprotokoll für erwachsene und junge Tiere angeführt. Wie aus den Tabellen zu ersehen ist, erfolgt der Kreatinstoffwechsel bei ihnen nicht gleichartig. Im Harn der erwachsenen Meerschweinchen findet sich bloß Kreatinin (Tabelle I); im Harn der jungen Meerschweinchen tritt neben dem Kreatinin stets auch Kreatin in verschiedenen, mitunter recht geringen Mengen auf (Tabelle II).

Tabelle I.

Versuchstag	Gesamt-N g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g
1.	0,1135	0,0041	—
2.	0,1043	0,0031	—
3.	0,1285	0,0051	—
4.	0,1165	0,0048	—
5.	0,1062	0,0056	—
6.	0,1463	0,0049	—
7.	0,1315	0,0036	—

[1] *E. Ssawron*, Pflügers Arch. 1927.

[2] Diese Untersuchungen über die Ausscheidung von Kreatin bei jungen Meerschweinchen und weißen Ratten wurden von einem von uns (*A. Palladin*) unter der Mithilfe von *E. Sajanskaja* und *A. Riskaltschuk* unternommen und schon in russischer Sprache veröffentlicht, blieben aber im Auslande vollkommen unbekannt. Infolgedessen hielten wir ihre kurze Veröffentlichung zusammen mit dieser Arbeit (Über die Abhängigkeit der kindlichen Kreatinurie von der Schilddrüse) für nicht überflüssig.



Tabelle II.

Versuchstag	Gesamt-N g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g
1.	0,0833	0,0015	0,0007
2.	0,0663	0,0011	0,0010
3.	0,1091	0,0012	0,0013
4.	0,0943	0,0011	0,0017

Beim Vergleich der Kreatininkoeffizienten erwachsener und junger Meerschweinchen finden wir, daß er bei den letzteren größer ist (siehe Tabelle III). Bei den jungen Tieren beträgt er 9,6 und bei den erwachsenen 7,2 bis 8,3 mg. Ebenso kommt bei den jungen Tieren pro Kilogramm Körpergewicht mehr an Gesamtstickstoff zur Ausscheidung als bei den erwachsenen.

Tabelle III.

	Gewicht der Meerschweinchen g	Stickstoff (in mg) pro kg Körpergewicht	
		Gesamt	Kreatinin + Kreatin (Kreatininkoeffizient)
Junge	290	228,6	9,6
	251	352,0	9,6
	223	330,9	9,7
Erwachsene . .	511	176,5	7,2
	514	192,6	7,9
	542	209,1	8,3

In den Versuchen mit weißen Ratten befanden sich die erwachsenen Tiere in einem Alter von 10 bis 24 Monaten, die jungen in einem Alter von 1 bis 4 bis 5 Monaten. Diese wie jene bekamen kreatinfreie Nahrung, die aus Brot, Käse und Fett bestand. In den Tabellen IV und V sind zwei Versuchsprotokolle mit erwachsenen Tieren, in der Tabelle VI das Protokoll eines Versuches mit einem jungen Tiere wiedergegeben.

Tabelle IV.

Versuchstag	Gesamt-N g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g
1.	0,144	0,0028	—
2.	0,133	0,0030	—
3.	0,156	0,0020	—

Tabelle V.

Versuchstag	Gesamt-N g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g
1.	0,093	0,0025	—
2.	0,085	0,0019	—
3.	0,101	0,0028	—

Tabelle VI.

Versuchstag	Gesamt-N g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g
1.	0,074	0,0008	0,0009
2.	0,064	0,0009	0,0007
3.	0,078	0,0009	0,0012
4.	0,073	0,0013	0,0005

Wie aus den Tabellen zu ersehen ist, ist im Harn der erwachsenen weißen Ratten nur Kreatinin enthalten, während im Harn der noch im Wachstum begriffenen Tiere stets auch Kreatin auftritt.

Der Kreatinstoffwechsel erwachsener weißer Ratten wurde auch von *Hataj* und *Folin* und *Morris* untersucht. Unsere Resultate stimmen nicht mit den Angaben von *Folin* und *Morris* in dem Punkte überein, an dem sie behaupten, daß im Harn weißer Ratten stets (always) Kreatin in nicht großer Menge vorkommt. Bei uns schieden die erwachsenen Ratten bei kreatinfreier Nahrung nur Kreatinin aus. Anders verhält es sich, wenn die Ratten mit Fleisch gefüttert werden. Beigabe von Fleisch zur Nahrung ruft, wie aus der Tabelle VII zu ersehen ist, augenblicklich Auftreten von Kreatin im Harne hervor und vergrößert die Ausscheidung von Kreatinin, d. h. das im Fleische enthaltene Kreatin verwandelt sich zum Teil in Kreatinin (wodurch die normale Kreatininausscheidung vermehrt wird), zum Teil wird es direkt als exogenes Kreatin ausgeschieden.

Tabelle VII.

Durchschnittlich pro Tag		Futter
Kreatinin g	Kreatin g	
0,0064	—	kreatinfrei
0,0085	0,0104	mit Fleisch (enthält pro Tag 0,02 g Kreatin)

Auf diese Weise scheidet sich bei kreatinfreier Nahrung Kreatin bloß bei jungen weißen Ratten aus.

Wie aus der Tabelle VIII zu ersehen ist, ist der Kreatininkoeffizient bei jungen weißen Ratten ebenso wie bei den jungen Meerschweinchen größer als bei erwachsenen Tieren.

Tabelle VIII.

	Gewicht der Ratten g	Kreatininkoeffizient (Kreatin + Kreatinin-N in mg pro Körperkilo)
Erwachsene	206	12,6
	184	13,0
Junge	120	15,0

In Zusammenfassung dieser Versuche müssen wir sagen, daß bei jungen (noch wachsenden) Meerschweinchen und weißen Ratten bei kreatinfreier Nahrung neben dem Kreatinin im Harne stets auch Kreatin enthalten ist.

II. Versuche mit normalen und thyreoidektomierten jungen Hunden.

Was ist nun die Ursache der obenbeschriebenen Kreatinurie der Kinder?

Krause meint, daß die Kreatinausscheidung bei Kindern durch die (im Verhältnis zu den Erwachsenen) größere Intensität der Prozesse von Kreatinbildung in den Muskeln veranlaßt ist, während die Prozesse der weiteren Umwandlung in Kreatinin nicht erhöht sind. Die eben geschilderten Versuche mit Meerschweinchen und weißen Ratten weisen ebenfalls darauf hin, daß der Kreatinstoffwechsel bei wachsenden Tieren im Verhältnis zu dem der erwachsenen größer ist.

Folin und *Denis* erklären die Kreatinurie bei Kindern durch eine „exclusively high level of protein consumption (in proportion to mass of muscle in the body)".

Wovon kann nun diese große Intensität der Kreatinstoffwechselprozesse bei jungen Tieren abhängen? Wir wissen, in welcher Abhängigkeit von der Schilddrüse sich die Stickstoffwechselprozesse befinden. Spielt nicht sie vielleicht beim Zustandekommen der kindlichen Kreatinurie eine Rolle? Einer solchen Ansicht begegnen wir in der Literatur.

Daß die Hormone der Schilddrüse auf den Kreatinstoffwechsel einwirken können, ist durch die Versuche von *Krause* und *Cramer* festgestellt. Sie untersuchten den Einfluß der Schilddrüsenhormone auf die Kreatinausscheidung auf dem Wege der Verabreichung von Schafsschilddrüsen an Menschen und Hunde per os und fanden, daß hierbei im Harn stets Kreatin auftrat, dessen Menge die mit der Drüse aufgenommene um beträchtliches übertraf. Mit anderen Worten, seine Versuche zeigten, daß die Einführung von Hormonen der Schilddrüse die Prozesse der Kreatinbildung verstärken und das Auftreten von Kreatin im Harn verursachen, und daß in gleicher Weise auch die Hyperfunktion der Schilddrüse auf den Kreatinstoffwechsel von Einfluß sein müsse. Und in der Tat findet sich bei der *Basedow*schen Krankheit im Urin Kreatin auch bei dessen Abwesenheit in der Nahrung.

Yseke, welcher sich mit Beobachtungen über kindliche Kreatinurie beschäftigte, fand, daß sie bei myxödematösen Kindern fehlt, d. h. bei Kindern mit einer Hypofunktion der Schilddrüse.

Auf Grund dieses sprach *Yseke* die Vermutung aus, daß die kindliche Kreatinurie mit der Schilddrüsenfunktion in Zusammenhang zu bringen sei.

Auf die Angaben von *Krause* und *Yseke* sich stützend, untersuchte *Babitscheff* den Einfluß der Thyreoidektomie auf die Kreatinurie bei Hunden und kam zu dem Resultat, daß nach der Exstirpation der Schilddrüse die Kreatinurie bei jungen Hunden verschwinde.

Bei aufmerksamer Durchsicht der Protokolle *Babitscheffs* kann man sehen, daß einige Zeit nach der Exstirpation der Schilddrüse Kreatin von neuem im Harn auftritt; *Babitscheff* erklärt dies mit der Unterernährung

der jungen Hunde in dieser Periode. Allzu überzeugend wirkt dies auf pen Leser nicht ein, besonders weil die Beobachtungen bald darauf eingestellt worden.

Mit Rücksicht auf das große Interesse, das die Aufklärung des Mechanismus der kindlichen Kreatinurie vorstellt, und mit Rücksicht auf die Unzulänglichkeit des experimentellen Materials bezüglich dieser Frage beschlossen wir, den Gedanken eines möglichen Zusammenhanges zwischen kindlicher Kreatinurie und Schilddrüsenfunktion einer neuen experimentellen Prüfung zu unterziehen. Zu diesem Zweck beschlossen wir, den Einfluß der Thyreoidektomie auf die Kreatinausscheidung junger Tiere in seinen Einzelheiten zu untersuchen.

Als Versuchsobjekte dienten uns junge Hunde im Alter von 1 bis 1½ Monaten.

Im Verlauf der ganzen Untersuchungszeit befanden sie sich in besonderen Käfigen für Stoffwechselversuche. Der Urin wurde alle 2 Tage zur Untersuchung genommen (er wurde mit Thymol konserviert) und in ihm der Gesamtstickstoffgehalt nach der Methode von *Folin-Gulick* und der Kreatinin- und Kreatingehalt nach *Folin-Morris* bestimmt. Die Nahrung der Tiere bestand in Milch und Weißbrot. Im ganzen kamen 13 Hündchen zur Beobachtung. Von ihnen wurden acht thyreoidektomiert, fünf dienten zur Kontrolle. Hierbei wurden zur Kontrolle stets junge Tiere desselben Wurfes genommen, von dem auch andere zur Operation kamen.

In erster Linie stellten wir fest, daß bei den Hunden im Alter von 1 bis 1½ Monaten und älteren, bis zu 4 Monaten, bei kreatinfreier Nahrung neben dem Kreatinin stets auch Kreatin zur Ausscheidung kam. Als Beweis hierfür können die Protokolle der Kontrolltiere (die nicht operiert wurden) dienen, die in den Tabellen IX und X gebracht sind.

Tabelle IX. Hund Nr. 2, ♀. Alter 2 Monate.

Datum	Körpergewieht	Gehalt der Harnmenge von zwei Tagen an			
		Gesamt-N	Kreatinin-N	Kreatin-N	Kreatinin + Kreatin-N des Gesamt-N
1924	g	g	g	g	%
9. II.	1310	2,173	0,0245	0,0219	2,13
11. II.	1300	1,786	0,0189	0,0223	2,25
13. II.	1305	2,000	0,0178	0,0130	1,54
15. II.	1430	1,818	0,0231	0,0141	2,04
17. II.	1472	2,325	0,0197	0,0100	1,28
19. II.	1480	1,644	0,0231	0,0093	1,97
21. II.	1485	1,923	0,0178	0,0108	1,48
25. II.	1636	2,404	0,0238	0,0134	1,54
27. II.	1727	2,272	0,0241	0,0048	1,22
29. II.	1967	3,125	0,0286	0,0063	1,11
2. III.	2073	2,750	0,0324	0,0186	1,85
4. III.	2025	3,725	0,0346	0,0290	1,70
6. III.	2075	3,025	0,0387	0,0275	2,16
10. III.	2230	2,727	0,0290	0,0216	1,85
12. III.	2285	3,263	0,0372	0,0231	1,84

Tabelle X.

Hund Nr. 13 desselben Wurfes wie Nr. 12. Alter 1½ Monate.

Datum 1925/26	Körpergewicht g	Gehalt der Harnmenge von zwei Tagen an Gesamt-N g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g	Kreatinin + Kreatin-N des Gesamt-N %
30. XII.	1200	0,525	0,009	0,001	1,90
1. I.	1180	0,851	0,012	0,001	1,52
9. I.	1350	1,666	0,018	0,009	1,62
17. I.	1650	2,000	0,030	0,006	1,80
21. I.	1850	1,176	0,017	0,016	2,79
29. I.	1800	1,538	0,025	0,005	1,94

Bei den zur Operation bestimmten Tieren wurde vorerst die Norm der Ausscheidung von Kreatinin, Kreatin und Gesamtstickstoff festgestellt, und erst dann wurde die Schilddrüse exstirpiert und wenigstens zwei Nebenschilddrüsen stehengelassen; bei einem gelang es drei Nebenschilddrüsen, bei zweien vier zu erhalten; nach Beendigung der Versuche wurden die Tiere getötet und wurde durch Sektion die Abwesenheit der Schilddrüse und die Unversehrtheit der Epithelkörperchen festgestellt.

In den Tabellen XI bis XIV sind die Protokolle von vier thyreoidektomierten jungen Hunden und in den Tabellen IX bis X die Protokolle von zwei Versuchen mit Kontrolltieren wiedergegeben.

Tabelle XI.

Hund Nr. 1, ♀, desselben Wurfes wie Nr. 2. Alter 2 Monate.

Datum 1924	Körpergewicht g	Gehalt der Harnmenge von zwei Tagen an Gesamt-N g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g	Kreatinin + Kreatin-N des Gesamt-N %	
9. II.	1350	2,631	0,0193	0,0060	0,96	10. II. Thyreoidektomie
13. II.	1370	1,851	0,0137	0,0030	0,90	
15. II.	1490	1,786	0,0312	0,0026	1,83	
17. II.	1535	2,000	0,0152	0,0033	0,92	
19. II.	1560	1,421	0,0204	0,0007	1,48	
21. II.	1595	1,786	0,0182	—	1,02	
25. II.	1790	2,272	0,0197	0,0089	1,26	
27. II.	1925	2,272	0,0245	0,0126	1,63	
29. II.	2162	2,841	0,0275	0,0074	1,23	
2. III.	2240	2,579	0,0331	0,0115	1,73	
4. III.	2300	2,954	0,0346	0,0153	1,69	
6. III.	2442	2,678	0,0372	0,0123	1,84	
8. III.	2412	2,822	0,0361	0,0216	2,04	
10. III.	2395	2,586	0,0372	0,0156	2,04	
12. III.	2455	2,916	0,0405	0,0269	2,34	
14. III.	2450	2,016	0,0182	0,0141	1,85	
16. III.	2492	2,822	0,0383	0,0145	1,87	
18. III.	2543	4,605	0,0767	0,0175	2,04	
20. III.	2573	2,767	0,0413	0,0042	1,64	
22. III.	2573	2,717	0,0454	0,0093	2,01	
24. III.	2725	2,976	0,0454	0,0074	1,77	

Tabelle XII.

Hund Nr. 6, ♂. Alter 1 Monat.

Datum 1925	Körpergewicht g	Gehalt der Harnmenge von zwei Tagen an Gesamt-N g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g	Kreatinin + Kreatin-N des Gesamt-N %	
27. IX.	900	1,136	0,014	0,006	1,75	27. IX. Thyreoidektomie
29. IX.	850	1,470	0,015	0,001	1,09	
1. X.	900	1,923	0,015	0,002	0,88	
3. X.	1000	1,724	0,015	0,002	0,98	
5. X.	950	1,724	0,017	0,002	1,10	
7. X.	1050	1,666	0,013	—	0,78	
9. X.	1150	1,786	0,020	—	1,12	
11. X.	1250	1,852	0,022	0,001	1,24	
13. X.	1250	1,923	0,021	0,004	1,35	
24. X.	1300	2,633	0,032	0,004	1,36	
26. X.	1300	2,604	0,025	0,004	1,11	
28. X.	1400	—	0,025	0,012	—	

Tabelle XIII.

Hund Nr. 11, ♂. Alter 2 Monate.

Datum 1925/26	Körpergewicht g	Gehalt der Harnmenge von zwei Tagen an Gesamt-N g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g	Kreatinin + Kreatin-N des Gesamt-N %	
20. XII.	2200	1,250	0,030	0,075	8,40	21. XII. Thyreoidektomie
22. XII.	2150	1,389	0,029	0,045	5,32	
24. XII.	1800	1,666	0,027	0,015	2,52	
26. XII.	2000	1,250	0,025	0,001	2,08	
28. XII.	2000	1,111	0,023	0,004	2,43	
30. XII.	2000	1,666	0,032	0,001	2,00	
1. I.	2000	1,739	0,030	0,003	1,89	
3. I.	2000	1,481	0,026	0,005	2,09	
7. I.	2000	1,659	0,035	—	2,11	
9. I.	2000	2,119	0,034	0,003	1,84	
11. I.	1850	3,125	0,031	0,004	1,12	
13. I.	1850	2,500	0,032	0,003	1,40	
17. I.	2250	4,546	0,037	0,016	1,16	
21. I.	2400	3,571	0,038	0,003	1,15	
23. I.	2450	2,631	0,039	0,006	1,71	
29. I.	2700	3,472	0,049	0,018	1,93	

Wie aus der Tabelle XI zu ersehen ist, begann die Kreatinausscheidung nach der Operation sich zu vermindern und stellte sich am zehnten Tage ganz ein, um am 14. Tage von neuem aufzutreten und weiterhin, solange das Tier im Versuche stand, nicht mehr aus dem Harn zu verschwinden (die Kreatinausscheidung war nicht unbeträchtlich). Der Versuch zeigte somit, daß die Exstirpation der Schilddrüse, die stets von einer Herabsetzung des Stickstoffwechsels begleitet ist, eine nur kurzdauernde, 1 bis 2 Tage anhaltende Unterbrechung der Kreatinurie hervorrief, sie aber

Tabelle XIV.

Hund Nr. 12 desselben Wurfes wie Nr. 13 (Tabelle X). Alter 1½ Monate.

Datum 1925/26	Körpergewicht g	Gehalt der Harnmenge von zwei Tagen an Gesamt-N g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g	Kreatinin + Kreatin-N des Gesamt-N %	
22. XII.	1400	1,333	0,021	0,028	3,69	21. XII. Thyreoidektomie
24. XII.	1350	1,333	0,025	0,013	2,10	
26. XII.	1300	1,020	0,022	—	2,15	
28. XII.	1300	1,481	0,027	0,003	2,02	
30. XII.	1420	1,333	0,005	0,003	0,60	
1. I.	1500	1,250	0,006	0,003	0,72	
3. I.	1500	1,250	0,012	0,003	1,20	
7. I.	1450	1,666	0,014	0,004	1,08	
9. I.	1550	2,631	0,037	—	1,40	
11. I.	1520	3,846	0,040	0,006	1,19	
13. I.	1680	2,833	0,033	0,008	1,44	
17. I.	1800	2,941	0,035	0,006	1,45	
19. I.	1850	2,174	0,031	0,003	1,56	
23. I.	1900	2,273	0,041	0,020	2,69	
29. I.	1950	1,739	0,037	0,002	2,24	

nicht vollkommen zu beseitigen vermochte; und bei dem thyreoidektomierten Tiere kam die ganze Zeit, wie bei den Kontrolltieren, neben dem Kreatinin auch Kreatin zur Ausscheidung.

Das gleiche Resultat erhielten wir in allen anderen Fällen mit Schilddrüsenexstirpation (Tabelle XII bis XIV), und die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchen bestanden bloß darin, daß in den einen bei den jungen Hunden die Schilddrüsenentfernung ein vorübergehendes Verschwinden des Kreatins aus dem Urin, bei den anderen bloß eine Herabsetzung der Kreatinausscheidung herbeiführte. Wenn man die in den ersten zwei Wochen nach der Operation auftretende Einwirkung der Thyreoidektomie nicht in Betracht zieht, so bestand weiterhin bei allen operierten Hunden eine ebensolche Kreatinurie wie bei den Kontrolltieren, nur mit dem Unterschied, daß bei den ersteren die Kurve der Kreatinausscheidung nach der Operation auf einem etwas niedrigeren Niveau stand als bei den letzteren.

Auf diese Weise zeigten die Versuche, daß die kindliche Kreatinurie nicht in Verbindung gesetzt werden kann mit der Funktion der Schilddrüse, denn nach deren Entfernung hört die Kreatinausscheidung nicht auf, wie nach *Yseke*s Schlußfolgerungen erwartet werden kann, sondern besteht gleich wie bei den unoperierten Tieren weiter.

III. Versuche mit Kaninchen.

In Ergänzung der Versuche mit jungen Hunden entschlossen wir uns auch, noch Versuche mit Kaninchen anzustellen, und zwar um so mehr, als in der Literatur keine Mitteilungen über die Kreatinausscheidung junger Kaninchen vorliegen. Im Versuche standen zwei Kontroll- und zwei operierte

Kaninchen eines Alters von 3 bis 4 Wochen; ihre Nahrung bestand anfangs in Milch und später in Milch und Brot.

Tabelle XV.

Kaninchen Nr. 2. Alter 1 Monat.

Datum 1924	Körpergewicht g	Gehalt der Harnmenge von zwei Tagen an			
		Gesamt-N g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g	Kreatinin + Kreatin-N des Gesamt-N %
7. V.	220	0,240	0,0037	0,0004	1,71
9. V.	222	0,400	0,0052	0,0011	1,57
11. V.	220	0,277	0,0026	0,0004	1,09
13. V.	254	0,217	0,0045	0,0019	2.95
15. V.	258	0,294	0,0071	0,0019	3.40
17. V.	258	0,217	0,0074	0,0004	3,59
19. V.	289	0,291	0,0126	0,0007	4,53
21. V.	294	0,400	0,0091	0,0019	2,75
23. V.	300	0,416	0,0119	0,0019	3,31
25. V.	305	0,322	0,0086	0,0007	2,89
27. V.	318	0,416	0,0126	0,0019	3,48

Die Versuche zeigten vor allem, daß auch bei jungen Kaninchen eine „kindliche“ Kreatinurie besteht (Tabelle XV). Die Entfernung der Schilddrüse hatte auch bei ihnen keine Einstellung der „kindlichen“ Kreatinurie zur Folge. Als Folge der Thyreoidektomie tritt, wie dies aus der Tabelle XVI zu ersehen ist, bei den Kaninchen bloß eine vorübergehende Verminderung der Kreatinausscheidung auf.

Tabelle XVI.

Kaninchen Nr. 3. Alter 1 Monat.

Datum 1924	Körpergewicht g	Gehalt der Harnmenge von zwei Tagen an				
		Gesamt-N g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g	Kreatinin + Kreatin-N des Gesamt-N g	
5. V.	227	0,400	0,0052	0,0016	1,70	8. V. Thyreoidektomie
7. V.	247	0,463	0,0082	0,0016	2,11	
9. V.	267	0,385	0,0060	0,0014	1,92	
11. V.	269	0,532	0,0060	0,0004	1,20	
13. V.	278	0,609	0,0123	0,0033	2,56	
15. V.	302	0,393	0,0089	0,0004	2,36	
17. V.	324	0,400	0,0074	0,0001	1,85	
19. V.	315	0,446	0,0126	0,0019	3,25	
21. V.	328	0,500	0,0115	0,0033	2,96	
23. V.	338	0,476	0,0156	0,0030	3,91	
25. V.	340	0,588	0,0153	0,0093	4,18	
27. V.	338	0,625	0,0134	0,0042	2,81	
29. V.	349	0,555	0,0149	0,0015	2,95	

Nachdem wir in diesen beiden Versuchen mit Kaninchen die gleichen Resultate erhalten hatten wie mit den Hunden, beschlossen wir, weitere

Versuche mit ihnen nicht anzustellen[1], da die Versuche mit den jungen Hunden uns schon eine genug eindeutige Antwort auf die von uns gestellte Frage gaben.

IV. Schlußbetrachtungen.

Die Versuche mit thyreoidektomierten jungen Hunden und Kaninchen zeigen uns also, daß die Entfernung der Schilddrüse die Kreatinurie nicht einstellt und daß demnach die kindliche Kreatinurie mit der Schilddrüsenfunktion nicht in Verbindung gebracht werden darf.

Es läßt sich in der Tat schwer vorstellen, daß die Schilddrüse im wachsenden Organismus eine erhöhte Funktion besäße (man denke an den Thymus und seinen hemmenden Einfluß auf die Schilddrüse) oder daß der wachsende Organismus eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber den Hormonen der Schilddrüse zeige.

Die experimentellen Untersuchungen sprechen für das gerade Gegenteil. So fand auch *Mark* bei der Untersuchung der Wirkung der Schilddrüsenpräparate auf junge und erwachsene Hunde (als Indikatoren dienten Stickstoffausscheidung, Auftreten von Kreatin, Diurese, Puls und Gewicht), daß die Hunde im Alter von unter 4 Monaten auch auf große Dosen von Schilddrüsenpräparaten, welche bei erwachsenen Hunden Erhöhung des Stickstoffwechsels, Auftreten von Kreatinurie usw. hervorriefen, nicht reagierten. Das gleiche Resultat geben auch Beobachtungen an Kindern bei Verabreichung von Schilddrüsenpräparaten.

Wenn man auch einen Zusammenhang zwischen kindlicher Kreatinurie und einer der Drüsen mit innerer Sekretion suchen will, so erscheint es nur natürlich, in erster Linie an die Drüse zu denken, die im Kindesalter funktioniert, nämlich die Thymusdrüse.

Einen Einfluß dieser Drüse auf die Kreatinausscheidung junger Tiere untersuchte mittels Thymektomie *Lydia Palladin* und *Neurath*. Nach den Angaben ersterer kommt es nach Thymektomie zu einem Verschwinden der Kreatinurie, die jedoch bald wieder erscheint. Nach den Angaben des letzteren bringt Thymektomie die kindliche Kreatinurie ganz zum Verschwinden, und sie kehrt nur in dem Falle wieder, wenn bei der Operation kleine Drüsenstückchen unentfernt geblieben waren.

Zusammenfassung.

1. Die kindliche Kreatinurie stellt eine verschiedenen Säugetieren zukommende Erscheinung vor.

2. Im Harn junger (noch im Wachstum begriffener) Meerschweinchen, weißer Ratten, Hunde (unter 4 bis 5 Monaten) und

[1] Dies um so mehr, weil die Resultate der Versuche mit Kaninchen in Zweifel gezogen werden können durch die Möglichkeit eines Vorhandenseins von überzähligen Schilddrüsen.



Kaninchen (eines Alters von 3 bis 6 Wochen) kommt bei kreatinfreier Nahrung nicht bloß Kreatinin, sondern auch Kreatin zur Ausscheidung.

3. Bei jungen Tieren, in der Periode der „kindlichen“ Kreatinurie. ist der Kreatinkoeffizient größer als bei erwachsenen.

4. Exstirpation der Schilddrüse ruft bei jungen Hunden in der Periode der kindlichen Kreatinurie kein Aufhören derselben hervor; nach erfolgter Thyreoidektomie kommt es zu einer vorübergehenden (kurzdauernden, bald stärkeren, bald geringeren) Herabsetzung der Kreatinausscheidung und im weiterem Verlaufe zu einer im allgemeinen etwas niedrigeren Höhe der Kreatinurie, als sie bei den Kontrolltieren ist.

5. Auch bei Kaninchen unterbricht die Thyreoidektomie die kindliche Kreatinurie nicht.

6. Die Versuche über den Einfluß der Thyreoidektomie auf die „kindliche“ Kreatinurie zeigte, daß die letztere mit der Funktion der Schilddrüse nicht in Verbindung zu setzen ist.

Literatur.

Amberg and *Morril*, Journ. of biol. Chem. **3**, 311, 1907. — *Wolf*, ebendaselbst **10**, 473, 1911/12. — *Closson*, Amer. Journ. of Physiol. **16**, 252, 1906. — *Krause*, Journ. of Physiol. **7**, 87, 1913. — *Krause* und *Cramer*, ebendaselbst **40**, 61, 1910; **42**, 42, 1911; **44**, 23, 1912. — *McCollum* and *Steenbock*, Journ. of biol. Chem. **13**, 209, 1911/12. — *McCrudden* and *Sergent*, ebendaselbst **24**, 423, 1916. — *Powis* and *Raper*, Biochem. Journ. **10**, 363, 1916. — *Rose*, Journ. of biol. Chem. **10**, 265, 1911. — *Folin* and *Denis*, ebendaselbst **11**, 253, 1912. — *Schwarz*, Jahrb. d. Kinderheilkde. **72**, 549, 1910. — *Babitscheff*, Wratschebnoje Djelo 1924, Nr. 16/17. — *Iseke*, Monatsh. f. Kinderheilkde. **21**, 337, 1921. — *Mark*, Pflügers Arch. **209**, 437, 1925. — *Lydia Palladin*, Prof. Trinklers Festschr. Charkow 1924. — *Macciotta*, Pediatria **33**, 360, 1925.

Fortgesetzte Untersuchungen über den Einfluß von Fleischaufnahme auf den respiratorischen Stoffwechsel nach verschiedener Vorbehandlung von Ratten mit Rücksicht auf die Leberfunktion.

Von

Tateyoshi Honda.

[Aus dem Physiologischen Institut (Hallerianum) der Universität Bern.]

(Eingegangen am 26. September 1927.)

Mit 10 Abbildungen im Text.

In zwei voraufgegangenen Arbeiten hatte ich mich mit dem Einfluß von Fleischaufnahme, auf den Grundumsatz geprüft, in Versuchen in der Respirationskammer befaßt. Die erste behandelte die Umsatzsteigerung nach Fleischaufnahme, wenn die Ratten mit Fett vorgefüttert worden waren. Die Vorfütterung beseitigte oder verminderte erheblich das, was die spezifisch-dynamische Wirkung von Fleisch genannt wird. Die zweite Arbeit untersuchte die spezifisch-dynamische Wirkung von Fleisch nach Vorbehandlung mit Kohlehydraten. Hier trat die bekannte Wirkung des Fleisches auf. Die nachfolgende Arbeit geht von einer anderen Vorbehandlung aus, um die spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches zu untersuchen. In dieser Arbeit habe ich die Ratten mit Fleisch und Pepton reichlich gefüttert und dann erst die spezifisch-dynamische Wirkung geprüft. Der Gedanke, der hierbei leitend war, war der, daß durch reichliche Fütterung mit Fleisch und Pepton die Leber, wie zahlreiche Arbeiten des Berner Physiologischen Instituts gezeigt haben, sehr in Anspruch genommen wird und daß namentlich die kohlehydratumbildende Leistung der Leber vermindert wird, eine Veränderung, die durch eine Reihe eingehender Arbeiten von *Junkersdorf* aus dem Bonner Physiologischen Institut bestätigt worden ist. Es war naheliegend, eine weitere Vorbehandlung der Ratten mit einzubeziehen, nämlich die Vorbehandlung mit Phlorrhizin. Wie das Pepton, so wird auch das Phlorrhizin angewandt, wenn es sich

darum handelt, tiefgehend den Kohlehydratbestand des Organismus zu verändern. Die kombinierte Fütterung mit Pepton, Schilddrüse und Phlorrhizin bildet ja eine wesentliche Grundlage der Berner Methode, um Ratten praktisch kohlehydratfrei zu machen. Auch sprechen sehr viele Tatsachen dafür, daß Phlorrhizin die Stoffwechselverhältnisse der Leber verändert, so daß, wenn man es nicht für ausgeschlossen erachtet, daß die Leber an der spezifisch-dynamischen Wirkung des Fleisches mit beteiligt ist, auch aus diesem Grunde die Phlorrhizinvorbehandlung indiziert erscheint.

Meine Versuche zerfallen, dem mir von Prof. *Asher* vorgeschlagenen Plane zufolge, in 4 Serien. In der ersten Serie (A) wurde der Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten ermittelt. Hierauf folgte die zweite Serie (B) von Versuchen, wo die spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei der gleichen Diät festgestellt wurde. Die dritte Serie (C) beschäftigte sich mit dem Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten. In der vierten Serie (D) wurde schließlich die spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei diesem Ernährungsregime ermittelt.

Die Fleischdiät wurde so ausgeführt, daß das Tier täglich 22 bis 30 g ausgekochtes, möglichst kohlehydratfrei gemachtes Fleisch erhielt, 2 g Pepton, in Wasser gelöst, wurden täglich per os mittels einer Spritze gegeben. Die Anwendung von Phlorrhizin geschah nach der Methode von *Coolen* und den Angaben von *Graham Lusk*. Die Injektion geschah einen Tag um den anderen.

Die erste Versuchsreihe (A) und die dritte Versuchsreihe (C) begannen 6 bis 7 Tage nach dem Beginn der oben beschriebenen Diät. Die letzte Fütterung vor dem Beginn des Versuchs geschah 15 Stunden vorher. Zur Ermittlung der spezifisch-dynamischen Wirkung von Fleisch wurden 1 Stunde vor dem Beginn des Versuchs 10 g ausgekochtes Fleisch gereicht. Die Respirationsversuche geschahen in der üblichen Weise.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe bringe ich in den 5 folgenden Abbildungen und 5 Kurven, deren Inhalt aus den Legenden klar hervorgeht. Als Anhang am Schluß der Arbeit bringe ich die Einzelresultate in 6 Tabellen und einer Übersichtstabelle sämtlicher Versuche, Nr. VII.

In allen Versuchen zeigt sich, beurteilt nach der Größe der Kohlensäurebildung, des Sauerstoffverbrauchs und der gelieferten Kalorienmenge, eine recht erhebliche spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten. Die prozentische Steigerung der Kohlensäurebildung betrug durchschnittlich an 5 Tieren 21,61 %, die Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs 13,76 % und die Kalorienbildung erhöhte sich um durchschnittlich 15 %. Zu-

sammengefaßt, liegt demnach eine ganz erheblich spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei dieser Diät vor. Als jedoch die Tiere außer mit Fleisch und Pepton noch mit Phlorrhizin vorbehandelt wurden, erhöhte sich die spezifisch-dynamische Wirkung noch mehr. Ehe ich aber diese Erhöhung bespreche, betrachte ich den Grundumsatz. Hier zeigt sich, daß der Grundumsatz gegenüber dem anfänglichen Grundumsatz durchschnittlich um ein klein wenig vermindert war. Doch sind die Unterschiede so gering, daß man, da in den Einzelversuchen auch Erhöhungen vorkommen, wohl wird behaupten können, daß der Grundumsatz nicht wesentlich verändert war. Ganz anders steht es mit der spezifisch-dynamischen Wirkung. Hier zeigt sich eine Steigerung der Kohlensäurebildung auf 29,47 %, eine solche des Sauerstoffverbrauchs auf 26,17 % und der Kalorienlieferung auf 26,67 %. Es ist also in jedem Falle eine noch größere spezifisch-dynamische Wirkung infolge der Aufnahme von Fleisch eingetreten.

Aus dieser Tatsache geht hervor, wie sehr die Steigerung des Grundumsatzes nach Fleischaufnahme von der voraufgehenden Vorernährung abhängt. Aus dem einen Ende der Reihe stehen die Resultate bei andauernder einseitiger Fettfütterung, an dem anderen Ende der Reihe stehen die Resultate nach Vorfütterung mit Fleisch, Pepton und Phlorrhizin. Es wird sich nun darum handeln, die Resultate dieser Reihe zu erklären. Ich habe im Eingang meiner Arbeit darauf hingewiesen, daß Pepton jedenfalls die Leber affiziert, und daß es Gründe gibt, das gleiche für das Phlorrhizin anzunehmen. Man könnte nun daran denken, daß der Kohlehydratumsatz bei der von mir angewandten Diät gesteigert sei. Aber die Werte des respiratorischen Quotienten in meinen Versuchen sprechen nicht dafür. Zwar steigert sich bei jedem Tier in der Versuchsreihe (B) der respiratorische Quotient um Beträge, die zwischen 5,6 und 8,43 % liegen; aber diese Unterschiede sind nicht mehr groß und würden sich erklären durch eine geringfügige Erhöhung des Kohlehydratumsatzes infolge der Glykogenverdrängung durch Pepton aus der Leber. Aber was vor allem gegen die Deutung der Erhöhung des Grundumsatzes durch gesteigerten Kohlehydratumsatz spricht, ist die Tatsache, daß in der Versuchsreihe mit Hinzufügen von Phlorrhizininjektion die Steigerungen des respiratorischen Quotienten viel geringer sind. Folglich wird man an andere Reizwirkungen auf die Leber zu denken haben. Ich möchte die Vermutung äußern, daß unter dem Einfluß von Pepton, Fleisch und Phlorrhizin die Leber sich in einem gesteigerten Reizzustande befindet, und daß eine der Äußerungen dieses gesteigerten Reizzustandes die vermehrte spezifisch-dynamische Wirkung des aufgenommenen Fleisches ist. In diesem Sinne wäre ein neuer Anhaltspunkt für die Verknüpfung zwischen Leber und spezifisch-dynamischer Wirkung gegeben.

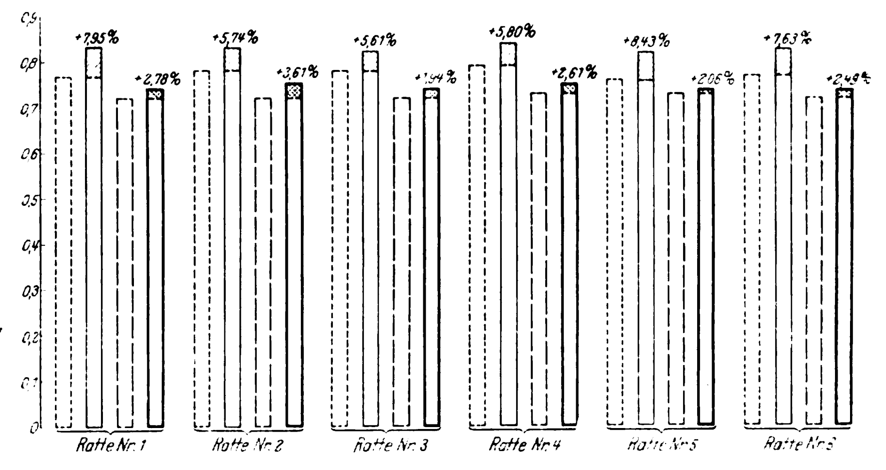


Abb. 1. Respirationsquotient.

- Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.
- Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.
- Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.
- Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.

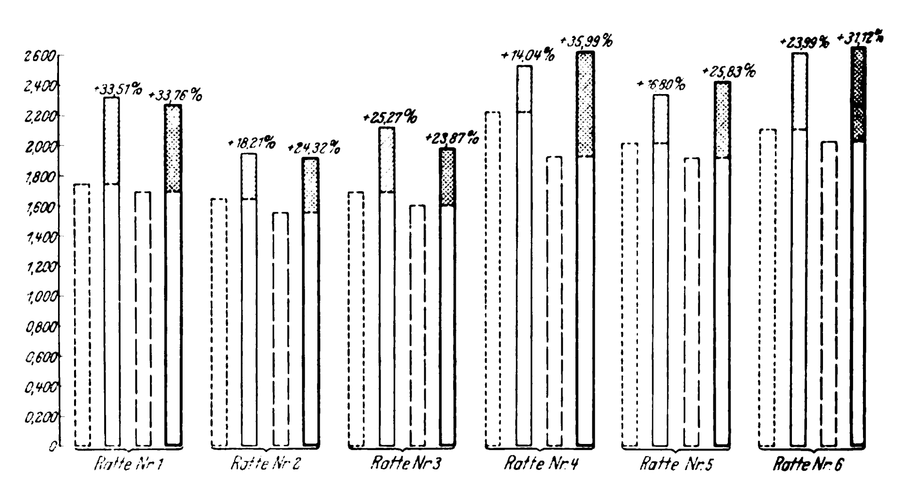


Abb. 2. CO_2 **pro kg und Stunde.**

- Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.
- Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.
- Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.
- Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.

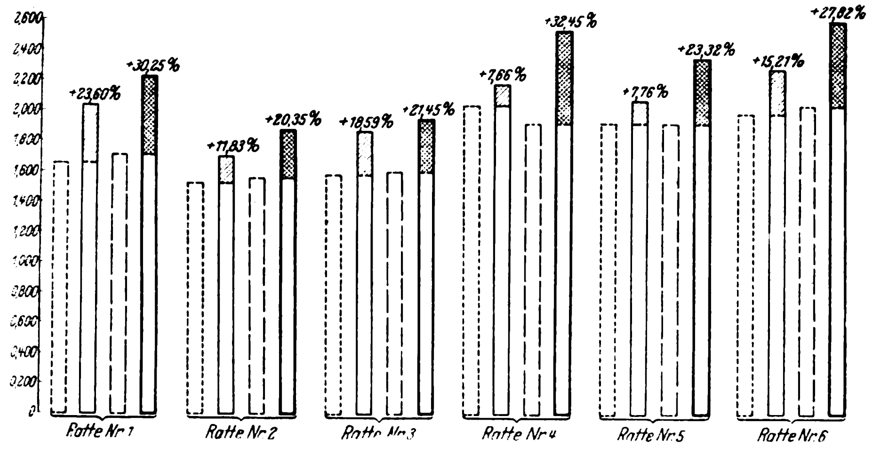


Abb. 3. O_2 pro kg und Stunde.

- **Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.**
- **Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.**
- **Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.**
- **Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.**

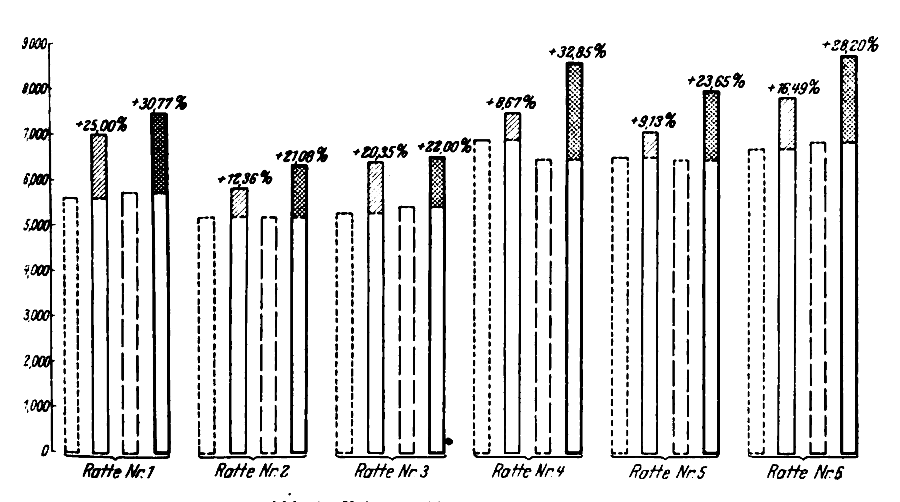


Abb. 4. Kalorienbildung pro kg und Stunde.

- **Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.**
- **Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.**
- **Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.**
- **Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.**

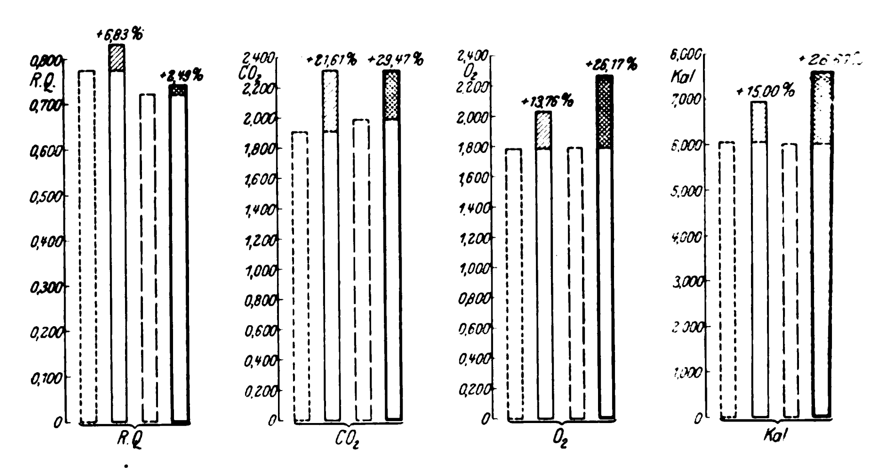


Abb. 5. Übersichtsabbildung.

- Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.
- Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.
- Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.
- Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.

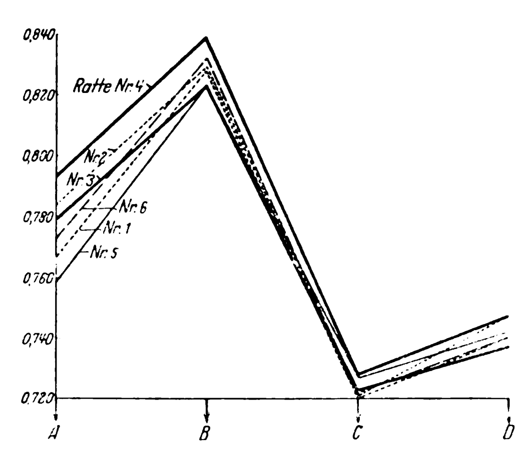


Abb. 6. Respirationsquotient.

A = Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.
B = Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch u. Pepton gefütterten Ratten.
C = Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.
D = Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.

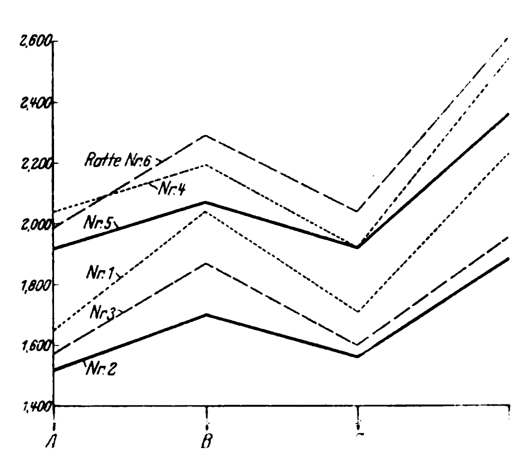


Abb. 7. CO_2 pro kg und Stunde.

A = Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.
B = Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch u. Pepton gefütterten Ratten.
C = Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.
D = Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.

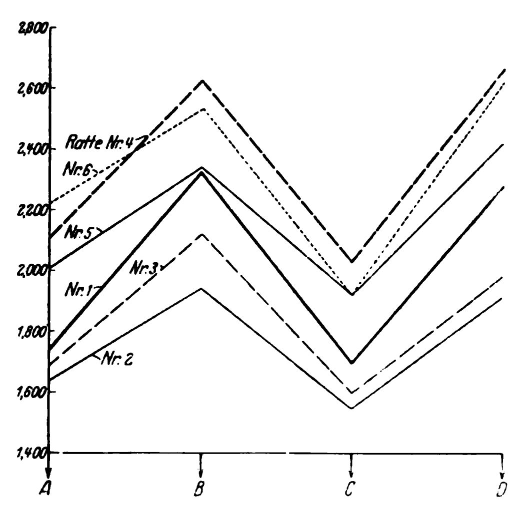


Abb. 8. O_2 pro kg und Stunde.

A = Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.
B = Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch u. Pepton gefütterten Ratten.
C = Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.
D = Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.

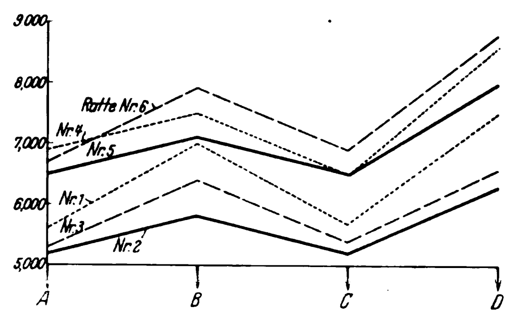


Abb. 9. Kalorienbildung pro kg und Stunde.

A = Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.
B = Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch u. Pepton gefütterten Ratten.
C = Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.
D = Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.

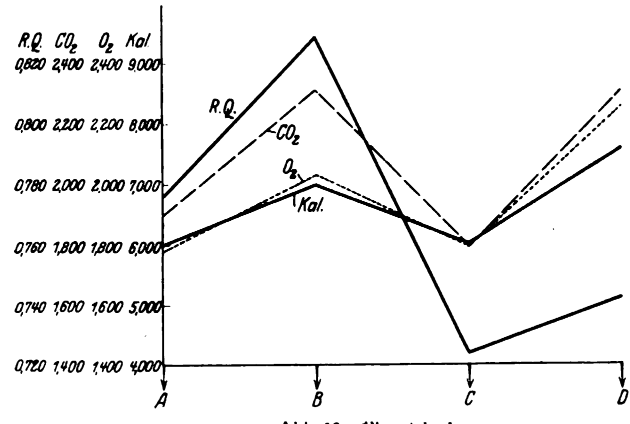


Abb. 10. Übersichtskurve.

A = Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.
B = Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch u. Pepton gefütterten Ratten.
C = Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.
D = Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.

Zusammengefaßt, ist der Inhalt der vorstehenden Arbeit der nachfolgende:

1. Nach voraufgegangener reichlicher Fütterung mit Fleisch und Pepton kommt es zu einer stark ausgesprochenen spezifisch-dynamischen Wirkung nach Fleischaufnahme.

2. Die Wirkung ist noch stärker, wenn außerdem noch einige Tage lang Phlorrhizin injiziert worden ist.

3. Ein Möglichkeit der Erklärung dieser Tatsache liegt in der Annahme, daß es sich um einen erhöhten Reizzustand der Leber in den genannten Versuchen handelt.

Tabelle I. Ratte Nr. 1. ♂.

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Gek. Rindfl. g	Futter: Pepton *Witte* Sic. g	Futter: Gek. Rindfl. g	Phlorrhizininjektion g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde
A. Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.															
1	1. II.	4	26	25	2			206,21	1,27	1,42	1,35	0,764	1,723	1,638	5,549
	2. II.			29	2										
2	3. II.	4	25	26	2			208,83	1,22	1,45	1,33	0,792	1,743	1,599	5,452
	4. II.			30	2										
3	5. II.	4	26	25,5	2			205,18	1,25	1,42	1,38	0,748	1,732	1,683	5,678
	6. II.			29,5	2										
4	7. II.	4	25	25	2			206,21	1,12	1,45	1,37	0,771	1,764	1,663	5,641
	8. II.			28,5	2										
5	9. II.	4	26	26	2			207,34	1,11	1,44	1,37	0,764	1,739	1,655	5,604
											Mittelwert:	0,767	1,740	1,648	5,585

25 bis 30 g ausgekochtes Rindfleisch und 2 g Pepton (das letztere per os mittels einer Spritze) wurden täglich den Ratten gereicht. Versuch geschah in nüchternem Zustande. Die letzte Fütterung wurde 15 Stunden vor Beginn des Versuchs gegeben.

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Gek. Rindfl. g	Futter: Pepton *Witte* Sic. g	Futter: Gek. Rindfl. g	Phlorrhizininjektion g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde
B. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.															
6	11. II.	4	25	24.5	2	10		216,77	1,27	2,06	1,81	0,827	2,384	2,095	7,174
	12. II.			29,5	2										
	13. II.			30,2	2										
7	14. II.	4	26	24,5	2	10		221,40	1,08	2,10	1,83	0,834	2,376	2,070	7,103
	15. II.			29	2										
8	16. II.	4	26	25	2	10		229,95	0,95	2,05	1,80	0,827	2,228	1,956	6,700
	17. II.			30	2										
9	18. II.	4	26	24,5	2	10		228,01	1,05	2,10	1,85	0,824	2,303	2,029	6,947
											Mittelwert:	0,828	2,323	2,037	6,981
											Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %, + vermehrt, — vermindert:	+ 7,95	+33,51	+23,60	+25,00

1 Stunde vor Beginn des Versuchs erhalten die Ratten 10 g ausgekochtes Rindfleisch. Sonst ist die Ernährungsweise genau wie bei Versuchsreihe A.

Tabelle I (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Gek. Rindfl. g	Futter: Pepton *Witte* Sic. g	Futter: Gek. Rindfl. g	Phlorrhizininjektion g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde
C. Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.															
10	25. II.	4	26	25	2			219,11	1,10	1,52	1,54	0,717	1,735	1,758	5,891
	26. II.			28	2										
	27. II.			29,5	2		0,05								
11	28. II.	4	27	25	2			211,35	1,05	1,39	1,41	0,716	1,647	1,671	5,598
	1. III.			29,5	2		0,05								
12	2. III.	4	26	24,5	2			206,71	1,18	1,36	1,35	0,731	1,651	1,638	5,517
	3. III.			30	2		0,05								
13	4. III.	4	26	25,5	2			203,13	1,23	1,42	1,44	0,716	1,749	1,774	5,942
											Mittelwert:	0,720	1,675	1,709	5,737
											Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %, + vermehrt, — vermindert:	— 6,13	—2,59	+3,70	+ 2,72

Die Ernährungsweise dieser Versuchsreihe ist derjenigen von A gleich. Außerdem wurde Phlorrhizin Tag über Tag subkutan injiziert. Die Menge betrug 0,05 g. Der erste Versuch begann erst 7 Tage nach der ersten Phlorrhizineinspritzung.

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Gek. Rindfl. g	Futter: Pepton *Witte* Sic. g	Futter: Gek. Rindfl. g	Phlorrhizininjektion g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde
D. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.															
14	7. III.	4	26	24,5	2	10		212,30	0,93	1,87	1,90	0,715	2,205	2,241	7,508
	8. III.			29,5	2		0,05								
15	9. III.	4	25	26	2	10		214,73	0,92	1,85	1,83	0,734	2,161	2,138	7,199
	10. III.			29	2		0,05								
16	11. III.	4	25	25	2	10		215,15	1,30	2,03	1,97	0,748	2,360	2,291	7,729
	12. III.			28	2										
	13. III.			29	2		0,05								
17	14. III.	4	26	24,5	2	10		216,32	1,25	2,05	1,99	0,748	2,373	2,303	7,771
	15. III.			29,5	2		0,05								
18	16. III.	4	26	25	2	10		216,16	1,30	1,94	1,89	0,745	2,245	2,187	7,380
	17. III.			28,5	2		0,05								
19	18. III.	4	26	26	2	10		217,12	1,08	1,97	1,91	0,749	2,270	2,201	7,424
											Mittelwert:	0,740	2,269	2,226	7,424
											Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:	— 3,52	+30,40	+35,07	+34,32
											" " " B, " " "	—10,63	— 2,32	+ 9,30	+ 9,47
											" " " C, " " "	+ 2,78	+33,86	+30,25	+30,77

+ vermehrt, — vermindert.

[1] Stunde vor Beginn des Versuchs erhalten die Ratten 10 g ausgekochtes Rindfleisch. Die Darreichung von Fleisch und Pepton, die Phlorrhizininjektionen, die zeitlichen Verhältnisse der Ausführung derselben erfolgten genau wie in der Versuchsreihe C.

Tabelle II. Ratte Nr. 2. ♂.

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Gek. Rindfl. g	Futter: Pepton *Witte* Sic. g	Gek. Rindfl. g	Phlorizininjektion g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde
								A. Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.							
1	29. I.	4	26	26	2			276,55	1,09	1,84	1,71	0,781	1,667	1,549	5,266
	30. I.			28	2										
	31. I.			30	2										
2	1. II.	4	26	24,5	2			278,26	0,92	1,83	1,68	0,791	1,646	1,511	5,153
	2. II.			29,5	2										
3	3. II.	4	25	25	2			279,01	1,09	1,68	1,54	0,793	1,875	1,719	5,862
	4. II.			30	2										
4	5. II.	4	26	24,5	2			275,43	1,15	1,71	1,64	0,776	1,555	1,455	4,735
	6. II.			29,5	2										
5	7. II.	4	25	25	2			275,97	1,00	1,71	1,59	0,781	1,549	1,440	4,896
	8. II.			30	2										
6	9. II.	4	26	24,5	2			277,82	1,02	1,73	1,61	0,784	1,561	1,453	4,940
											Mittelwert:	0,784	1,642	1,521	5,175

25 bis 30 g ausgekochtes Rindfleisch und 2 g Pepton *Witte* Sic. (per os mittels einer Spritze) wurden täglich den Ratten gereicht. Versuch geschah in nüchternem Zustande. Die letzte Fütterung wurde 15 Stunden vor Beginn des Versuchs gereicht.

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Gek. Rindfl. g	Futter: Pepton *Witte* Sic. g	Gek. Rindfl. g	Phlorizininjektion g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde
								B. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.							
7	11. II.	4	25	25	2	10		289,53	0,98	2,30	2,02	0,827	1,990	1,747	5,984
	12. II.			29	2										
	13. II.			28	2										
8	14. II.	4	26	24,5	2	10		292,85	1,19	2,17	1,91	0,825	1,858	1,635	5,600
	15. II.			29,5	2										
9	16. II.	4	26	24,5	2	10		297,39	1,06	2,36	2,05	0,836	1,986	1,726	5,921
	17. II.			30	2										
10	18. II.	4	26	25	2	10		298,04	1,04	2,30	2,02	0,827	1,930	1,695	5,803
											Mittelwert:	0,829	1,941	1,701	5,828
											Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %, + vermehrt, — vermindert:	+ 5,74	+18,21	+11,83	+12,63

1 Stunde vor Beginn des Versuchs erhalten die Ratten 10 g ausgekochtes Rindfleisch. Sonst ist die Ernährungsweise genau wie bei der Versuchsreihe A.

Tabelle II (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Gek. Rindfl. g	Futter: Pepton Witte Sic. g	Futter: Gek. Rindfl.[1] g	Phlorrhizininjektion g	Körpergewicht g	Totale HO_2-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde
C. Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.															
11	25. II.	4	26	24,5	2			286,70	0,91	1,83	1,86	0,715	1,600	1,626	5,448
	26. II.			28	2										
	27. II.			28,5	2		0,05								
12	28. II.	4	27	25	2			280,21	1,14	1,76	1,76	0,726	1,571	1,571	5,282
	1. III.			29,5	2		0,05								
13	2. III.	4	27	26	2			276,43	0,94	1,62	1,63	0,722	1,467	1,477	4,947
	3. III.			30	2		0,05								
14	4. III.	4	26	26	2			273,88	1,05	1,69	1,70	0,722	1,548	1,557	5,233
											Mittelwert:	0,721	1,546	1,558	5,227
											Vergleich mit A, ausgedrückt in %, + vermehrt, — vermindert:	— 8,04	— 5,85	+ 2,43	+ 1,01

Die Ernährungsweise dieser Versuchsreihe ist derjenigen von A gleich. Außerdem wurde Phlorrhizin Tag über Tag subkutan injiziert. Die Menge betrug 0,05 g. Der erste Versuch begann erst 7 Tage nach der ersten Phlorrhizineinspritzung.

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Gek. Rindfl. g	Futter: Pepton Witte Sic. g	Futter: Gek. Rindfl.[1] g	Phlorrhizininjektion g	Körpergewicht g	Totale HO_2-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde
D. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.															
15	7. III.	4	26	25	2	10		288,28	0,96	2,15	2,12	0,736	1,867	1,841	6,197
	8. III.			29	2		0,05								
16	9. III.	4	25	24,5	2	10		287,39	1,07	2,09	2,04	0,761	1,821	1,777	6,018
	10. III.			30	2		0,05								
17	11. III.	4	25	26	2	10		285,71	1,28	2,35	2,32	0,735	2,061	2,035	6,853
	12. III.			30	2										
	13. III.			29,5	2		0,05								
18	14. III.	4	26	24,5	2	10		282,79	0,98	2,18	2,12	0,747	1,933	1,879	6,341
	15. III.			30	2		0,05								
19	16. III.	4	26	25	2	10		285,46	1,24	2,19	2,08	0,764	1,921	1,825	6,180
	17. III.			29,5	2		0,05								
20	18. III.	4	26	26	2	10		280,39	1,02	2,19	2,12	0,740	1,929	1,893	6,386
											Mittelwert:	0,747	1,922	1,875	6,329
											Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:	— 4,72	—17,05	+23,27	+22,30
											„ „ „ B, „ „ „	— 9,89	— 0,98	+10,23	+ 8,60
											„ „ „ C, „ „ „	+ 3,61	+24,32	+20,35	+31,08

+ vermehrt, — vermindert.

[1] Stunde vor Beginn des Versuchs erhalten die Ratten 10 g ausgekochtes Rindfleisch. Die Darreichung von Fleisch und Pepton, die Phlorrhizininjektionen, die zeitlichen Verhältnisse der Ausführung derselben erfolgten genau wie in der Versuchsreihe C.

Tabelle III. **Ratte Nr. 3.** ♂.

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Gek. Rindfl. g	Futter: Pepton *Witte* Sic. g	Futter: Gek. Rindfl. g	Phlorhizininjektion g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde
A. Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.															
1	29. I.	4	26	24,5	2			262,16	1,23	1,81	1,73	0,760	1,727	1,651	5,591
	30. I.			29	2										
	31. I.			28	2										
2	1. II.	4	26	25	2			271,99	1,21	1,88	1,65	0,827	1,728	1,517	5,194
	2. II.			30	2										
3	3. II.	4	25	26	2			267,55	1,36	1,75	1,65	0,771	1,639	1,545	5,242
	4. II.			28	2										
4	5. II.	4	26	24,5	2			262,80	1,04	1,75	1,69	0,752	1,670	1,613	5,451
	6. II.			30	2										
5	7. II.	4	25	26	2			263,11	1,09	1,77	1,63	0,789	1,683	1,550	5,268
	8. II.			29,5	2										
6	9. II.	4	26	25	2			264,01	1,08	1,79	1,67	0,778	1,695	1,581	5,366
											Mittelwert:	0,779	1,690	1,576	5,317

25 bis 30 g ausgekochtes Rindfleisch und 2 g Pepton *Witte* Sic. (per os mittels einer Spritze) wurden täglich den Ratten gereicht. Versuch geschah in nüchternem Zustande. Die letzte Fütterung wurde 15 Stunden vor Beginn des Versuchs gereicht.

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Gek. Rindfl. g	Futter: Pepton *Witte* Sic. g	Futter: Gek. Rindfl. g	Phlorhizininjektion g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde
B. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.															
7	11. II.	4	25	26	2	10		276,11	1,20	2,37	2,04	0,844	2,147	1,848	6,353
	12. II.			29,5	2										
	13. II.			28,5	2										
8	14. II.	4	26	24,5	2	10		280,24	1,40	2,35	2,10	0,813	2,098	1,875	6,409
	15. II.			29	2										
9	16. II.	4	26	25	2	10		282,21	0,99	2,38	2,10	0,816	2,092	1,862	6,364
	17. II.			29	2										
10	18. II.	4	26	24,5	2	10		284,02	1,01	2,42	2,15	0,817	2,130	1,893	6,469
											Mittelwert:	0,823	2,117	1,869	6,399
											Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %, + vermehrt, — vermindert:	+ 5,61	+25,27	+18,59	+20,35

Eine Stunde vor Beginn des Versuchs erhalten die Ratten 10 g ausgekochtes Rindfleisch. Sonst ist die Ernährungsweise genau wie bei der Versuchsreihe A.

Tabelle III (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Gek. Rindfl. g	Futter: Pepton *Witte* Sic. g	Gek. Rindfl. g	Phlorrhizininjektion g	Körpergewicht g	Totale H_2O-bildung g	Totale CO_2-bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde
C. Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.															
11	25. II.	4	26	26	2			269,81	1,24	1,73	1,73	0,726	1,608	1,608	5,404
	26. II.			29	2										
	27. II.			29	2		0,05								
12	28. II.	4	27	25	2			264,77	1,03	1,72	1,75	0,714	1,629	1,657	5,553
	1. III.			29,5	2		0,05								
13	2. III.	4	26	24,5	2			259,68	0,92	1,67	1,67	0,726	1,612	1,612	5,402
	3. III.			30	2		0,05								
14	4. III.	4	26	25,5	2			257,58	1,06	1,58	1,58	0,726	1,537	1,537	5,166
											Mittelwert:	0,723	1,596	1,604	5,381
	Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %, + vermehrt, — vermindert:											— 7,19	— 5,56	+1,78	+1,20

Die Ernährungsweise dieser Versuchsreihe ist derjenigen von A gleich. Außerdem wurde Phlorrhizin Tag über Tag injiziert. Die Menge betrug 0,05 g. Der erste Versuch begann erst 7 Tage nach der ersten Phlorrhizineinspritzung.

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Gek. Rindfl. g	Futter: Pepton *Witte* Sic. g	Gek. Rindfl. g	Phlorrhizininjektion g	Körpergewicht g	Totale H_2O-bildung g	Totale CO_2-bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde
D. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.															
15	7. III.	4	26	25	2	10		266,52	1,14	2,07	2,02	0,744	1,945	1,945	6,405
	8. III.			29	2		0,05								
16	9. III.	4	25	24,5	2	10		263,05	1,23	2,03	1,98	0,744	1,930	1,882	6,350
	10. III.			30	2		0,05								
17	11. III.	4	25	26	2	10		262,43	1,13	2,17	2,07	0,761	2,070	1,975	6,690
	12. III.			29	2										
	13. III.			28	2		0,05								
18	14. III.	4	26	25	2	10		262,20	0,99	2,06	2,08	0,720	1,966	1,985	6,671
	15. III.			29	2		0,05								
19	16. III.	4	26	24,5	2	10		255,09	0,99	2,01	2,01	0,726	1,971	1,971	6,623
	17. III.			30	2		0,05								
20	18. III.	4	26	25	2	10		354,72	1,37	2,01	2,01	0,726	1,979	1,979	6,649
											Mittelwert:	0,737	1,977	1,943	6,565
	Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:											— 5,39	+16,98	+23,60	+23,47
	„ „ „ B, „ „ „ :											—10,45	— 6,61	+ 4,23	+ 2,59
	„ „ „ C, „ „ „ :											+ 1,94	+23,87	+21,45	+22,00

+ vermehrt, — vermindert.

1 Stunde vor Beginn des Versuchs erhalten die Ratten 10 g ausgekochtes Rindfleisch. Die Darreichung von Fleisch und Pepton, die Phlorrhizininjektionen, die zeitlichen Verhältnisse der Ausführung derselben erfolgten genau wie in der Versuchsreihe C.

Tabelle IV. Ratte Nr. 4. ♂.

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Gek. Rindfl. g	Futter: Pepton *Witte* Sic. g	Gek. Rindfl. g	Phlorrhizininjektion g	Körpergewicht g	Totale H_2O-bildung g	Totale CO_2-bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde
A. Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.															
1	8. II.	4	25	19	2			160,84	1,24	1,43	1,36	0,764	2,220	2,112	7,152
	9. II.			22	2										
2	10. II.	4	26	20	2			166.59	1,09	1,41	1,27	0,806	2,124	1,913	6.525
	11. II.			24	2										
3	12. II.	4	26	20,5	2			169,13	1,36	1,57	1,41	0,809	2,322	2,086	7,116
											Mittelwert:	0,793	2,222	2,037	6,931

20 bis 25 g ausgekochtes Rindfleisch und 2 g Pepton *Witte* Sic. (per os mittels einer Spritze) wurden täglich den Ratten gereicht. Versuch geschah in nüchternem Zustande. Die letzte Fütterung wurde 15 Stunden vor Beginn des Versuchs gereicht.

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Gek. Rindfl. g	Futter: Pepton *Witte* Sic. g	Gek. Rindfl. g	Phlorrhizininjektion g	Körpergewicht g	Totale H_2O-bildung g	Totale CO_2-bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde
B. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.															
4	15. II.	4	26	20	2	10		178,54	1,33	1,77	1.61	0,798	2,261	2,261	7.713
	16. II.			24,5	2										
5	17. II.	4	25	21	2	10		183,80	1,32	1,86	1,54	0.877	2,541	2,104	7,274
	18. II.			23,5	2										
6	19. II.	4	26	20	2	10		179,52	1,36	1,83	1,59	0,836	2,556	2,221	7,620
	20. II.			25	2										
7	21. II.	4	26	21	2	10		181,84	1,36	1,85	1,59	0,845	2,555	2,196	7,551
	22. II.			25	2										
8	23. II.	4	26	21	2	10		181,87	1,03	1,83	1,58	0,841	2,528	2,182	7,503
											Mittelwert:	0,839	2,534	2,193	7,532
											Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %, + vermehrt, — vermindert:	+ 5.80	+14,04	+ 7,66	+ 8,67

Eine Stunde vor Beginn des Versuchs erhalten die Ratten 10 g ausgekochtes Rindfleisch. Sonst ist die Ernährungsweise genau wie bei Versuchsreihe A.

Tabelle IV (Fortsetzung).

Versuch	Datum	Versuchsdauer	Temperatur im Kasten	Futter			Phlorrhizininjektion	Körpergewicht	Totale H_2O-Bildung	Totale CO_2-Bildung	Totaler O_2-Verbrauch	Respirationsquotient	CO_2	O_2	Kalorien
				Gek. Rindfl.	Pepton *Witte* Sic.	Gek. Rindfl.							pro kg und Stunde		
Nr.	1927	Std.	°C	g	g	g	g	g	g	g	g				
C. Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.															
9	1. III.	4	26	20	2			163,94	0,98	1,22	1,24	0,715	1,871	1,902	6,373
	2. III.			24	2		0,05								
10	3. III.	4	26	20	2			162,72	1,16	1,27	1,28	0,732	1,978	1,963	6,611
	4. III.			25	2		0,05								
11	5. III.	4	25	20,5	2			164,00	1,19	1,26	1,23	0,744	1,921	1,875	6,326
	6. III.			26	2										
	7. III.			24	2		0,05								
12	8. III.	4	26	19,5	2			156,31	0,88	1,20	1,21	0,720	1,923	1,939	6,518
Mittelwert:												0,728	1,923	1,920	6,457
Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %, + vermehrt, — vermindert:												— 8,20	—13,50	— 5,74	— 6,84

Die Ernährungsweise dieser Versuchsreihe ist derjenigen von A gleich. Außerdem wurde Phlorrhizin Tag über Tag subkutan injiziert. Die Menge betrug 0,05 g. Der erste Versuch begann erst 6 Tage nach der ersten Phlorrhizineinspritzung.

Versuch	Datum	Versuchsdauer	Temperatur im Kasten	Gek. Rindfl.	Pepton *Witte* Sic.	Gek. Rindfl.[1]	Phlorrhizininjektion	Körpergewicht	Totale H_2O-Bildung	Totale CO_2-Bildung	Totaler O_2-Verbrauch	Respirationsquotient	CO_2	O_2	Kalorien
D. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.															
13	10. III.	4	27	19,7	2	10		169,09	0,94	1,62	1.57	0,749	2,440	2,365	7,977
	11. III.			24,5	2		0,05								
14	12. III.	4	26	20	2	10		165,48	1,29	1,81	1,74	0,755	2,742	2,636	8,912
	13. III.			25	2										
	14. III.			26	2		0,05								
15	15. III.	4	26	22	2	10		165,31	1,05	1,70	1,67	0,739	2,576	2,530	8,521
	16. III.			25	2		0,05								
16	17. III.	4	26	20	2	10		165,42	1,47	1,80	1,76	0,743	2,727	2,667	8,997
	18. III.			24,5	2		0,05								
17	19. III.	4	26	20	2	10		168,23	1,26	1,74	1,69	0.747	2,589	2,515	8,485
Mittelwert:												0,747	2,615	2,543	8,578
Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:												— 5,80	+17,69	+24,84	+23,76
„ „ „ B, „ „ „												—10,97	+ 3,20	+15,96	+13,89
„ „ „ C, „ „ „												+ 2,61	+35,99	+32,45	+32,85

+ vermehrt, — vermindert.

1 Stunde vor Beginn des Versuchs erhalten die Ratten 10 g ausgekochtes Rindfleisch. Die Darreichung von Fleisch und Pepton, die Phlorrhizininjektionen, die zeitlichen Verhältnisse der Ausführung derselben erfolgten genau wie in der Versuchsreihe C.

Tabelle V. Ratte Nr. 5. ♂.

Versuch	Datum	Versuchsdauer	Temperatur im Kasten	Futter			Phlorrhizininjektion	Körpergewicht	Totale H_2O-Bildung	Totale CO_2-Bildung	Totaler O_2-Verbrauch	Respirationsquotient	CO_2	O_2	Kalorien
				Gek. Rindfl.	Pepton *Witte* Sic.	Gek Rindfl.							pro kg und Stunde		
Nr.	1927	Std.	°C	g	g	g	g	g	g	g	g				
A. Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.															
1	5. II.	4	25	20	2			189,81	1,25	1,49	1,45	0,747	1,961	1,908	6,437
	6. II.			25	2										
	7. II.			24,5	2										
2	8. II.	4	26	21,5	2			189,45	0,90	1,69	1,62	0,758	2,236	2,143	7,244
	9. II.			25	2										
3	10. II.	4	26	20,5	2			189,58	1,04	1,41	1,32	0,776	1,865	1,746	5,924
	11. II.			25	2										
4	12. II.	4	26	20,5	2			186,06	1,18	1,46	1,40	0,758	1,962	1,882	6,361
											Mittelwert:	0,759	2,006	1,919	6,492

20 bis 25 g ausgekochtes Rindfleisch und 3 g Pepton *Witte* Sic. (per os mittels einer Spritze) wurden täglich den Ratten gereicht. Versuch geschah in nüchternem Zustande. Die letzte Fütterung wurde 15 Stunden vor Beginn des Versuchs gereicht.

Versuch	Datum	Versuchsdauer	Temperatur im Kasten	Gek. Rindfl.	Pepton *Witte* Sic.	Gek Rindfl.	Phlorrhizininjektion	Körpergewicht	Totale H_2O-Bildung	Totale CO_2-Bildung	Totaler O_2-Verbrauch	Respirationsquotient	CO_2	O_2	Kalorien
B. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.															
5	15. II.	4	26	20,5	2	10		197,01	1,09	1,82	1,67	0,792	2,310	2,119	7,228
	16. II.			25	2										
6	17. II.	4	25	26	2	10		199,19	1,18	1,81	1,55	0,848	2,274	1,947	6,695
	18. II.			26	2										
7	19. II.	4	26	20,5	2	10		195,49	1,01	1,80	1,65	0,793	2,308	2,115	7,215
	20. II.			24,5	2										
8	21. II.	4	26	20	2	10		198,38	1,04	1,90	1,63	0,846	2,399	2,058	7,076
	22. II.			25	2										
9	23. II.	4	26	19,5	2	10		200,99	0,94	1,95	1,69	0,838	2,425	2,102	7,213
											Mittelwert:	0,823	2,343	2,068	7,085
											Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %, + vermehrt, — vermindert:	+ 8,43	+16,80	+7,76	+ 9,13

1 Stunde vor Beginn des Versuchs erhalten die Ratten 10 g ausgekochtes Rindfleisch. Sonst ist die Ernährungsweise genau wie bei der Versuchsreihe A.

Tabelle V (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Gek. Rindfl. g	Futter: Pepton *Witte* Sic. g	Futter: Gek. Rindfl. g	Phlorrhizininjektion g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde
C. Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.															
10	1. III.	4	26	20,5	2			180,82	0,82	1,40	1,37	0,731	1,944	1,931	6,501
	2. III.			26	2		0,05								
11	3. III.	4	26	21	2			177,64	1,00	1,33	1,32	0,726	1,865	1,865	6,266
	4. III.			24,5	2		0,05								
12	5. III.	4	25	20	2			177,07	1,01	1,34	1,34	0,726	1,893	1,893	6,361
	6. III.			25	2										
	7. III.			25	2		0,05								
13	8. III.	4	26	21	2			173,39	0,80	1,37	1,37	0,726	1,980	1,980	6,654
Mittelwert:												0,727	1,920	1,917	6,445
Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %, + vermehrt, — vermindert:												— 4,22	—4,29	—0,10	— 0,72

Die Ernährungsweise dieser Versuchsreihe ist derjenigen von A gleich. Außerdem wurde Phlorrhizin Tag über Tag subkutan injiziert. Die Menge betrug 0,05 g. Der erste Versuch begann erst 6 Tage nach der ersten Phlorrhizineinspritzung.

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Gek. Rindfl. g	Futter: Pepton *Witte* Sic. g	Futter: Gek. Rindfl. g	Phlorrhizininjektion g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde
D. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Tieren.															
14	10. III.	4	27	20,5	2	10		184,63	1,10	1,72	1,65	0,757	2,337	2,242	7,578
	11. III.			26	2		0,05								
15	12. III.	4	26	20	2	10		182,69	0,93	1,79	1,81	0,718	2,459	2,486	8,331
	13. III.			25	2										
	14. III.			25	2		0,05								
16	15. III.	4	26	20	2	10		185,29	1,18	1,80	1,70	0,767	2,432	2,297	7,781
	16. III.			24,5	2		0,05								
17	17. III.	4	26	19,5	2	10		184,44	0,91	1,79	1,77	0,735	2,432	2,405	8,099
	18. III.			25	2		0,05								
18	19. III.	4	26	21	2	10		185,16	1,01	1,79	1,77	0,734	2,419	2,392	8,055
Mittelwert:												0,742	2,416	2,364	7,969
Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:												— 2,24	+20,44	+23,19	+22,75
„ „ „ B. „ „ „												— 9,84	+ 3,12	+14,31	+12,48
„ „ „ C, „ „ „												+ 2,06	+25,83	+23,32	+23,65

+ vermehrt, — vermindert.

1 Stunde vor Beginn des Versuchs erhalten die Ratten 10 g ausgekochtes Rindfleisch. Die Darreichung von Fleisch und Pepton, die Phlorrhizininjektionen, die zeitlichen Verhältnisse der Ausführung derselben erfolgten genau wie in der Versuchsreihe C.

Tabelle VI. **Ratte Nr. 6.** ♂.

Versuch	Datum	Versuchsdauer	Temperatur im Kasten	Futter			Phlorrhizininjektion	Körpergewicht	Totale H_2O-Bildung	Totale CO_2-Bildung	Totaler O_2-Verbrauch	Respirationsquotient	CO_2	O_2	Kalorien
				Gek. Rindfl.	Pepton *Witte* Sic.	Gek. Rindfl.							pro kg und Stunde		
Nr.	1927	Std.	°C	g	g	g	g	g	g	g	g				
				A. Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.											
1	5. II.	4	25	19,5	2			171,55	1,12	1,45	1,40	0,752	2,120	2,047	6,919
	6. II.			22	2										
	7. II.			22	2										
2	8. II.	4	26	20	2			171,66	1,16	1,41	1,35	0,759	2,061	1,974	6,672
	9. II.			25	2										
3	10. II.	4	26	20	2			171,65	0,97	1,49	1,36	0,796	2,178	1,988	6,781
	11. II.			24,5	2										
4	12. II.	4	26	20	2			172,15	1,05	1,44	1,33	0,786	2,093	1,933	6,572
											Mittelwert:	0,773	2,113	1,985	6,736

20 bis 25 g ausgekochtes Rindfleisch und 2 g Pepton (das letztere per os mittels einer Spritze) wurden täglich den Ratten gereicht. Versuch geschah in nüchternem Zustande. Die letzte Fütterung wurde 15 Stunden vor Beginn des Versuchs gereicht.

Versuch Nr.	Datum	Versuchsdauer	Temperatur im Kasten	Gek. Rindfl.	Pepton	Gek. Rindfl.	Phlorrhizininjektion	Körpergewicht	Totale H_2O-Bildung	Totale CO_2-Bildung	Totaler O_2-Verbrauch	Respirationsquotient	CO_2	O_2	Kalorien
				B. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten.											
5	15. II.	4	26	20	2	10		181,76	1,39	1,84	1,65	0,810	2,541	2,279	7,790
	16. II.			24	2										
6	17. II.	4	25	20	2	10		184,28	1,46	1,94	1,68	0,839	2,636	2,283	7,833
	18. II.			25	2										
7	19. II.	4	26	19,5	2	10		183,15	1,02	1,92	1,72	0,811	2,623	2,380	8,032
	20. II.			24,5	2										
8	21. II.	4	26	20	2	10		182,86	1,26	1,97	1,66	0,862	2,706	2,280	7,869
	22. II.			24,5	2										
9	23. II.	4	26	20	2	10		185,12	0,84	1,92	1,66	0,840	2,595	2,243	7,712
											Mittelwert:	0,832	2,620	2,287	7,847
				Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %, + vermehrt, — vermindert:								+ 7,63	+23,99	+15,21	+16,49

Eine Stunde vor Beginn des Versuchs erhalten die Ratten 10 g ausgekochtes Rindfleisch. Sonst ist die Ernährungsweise genau wie bei Versuchsreihe A.

Tabelle VI (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Gek Rindfl. g	Futter: Pepton *Witte* Sic. g	Futter: Gek. Rindfl. g	Phlorrhizininjektion g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde
C. Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.															
10	1. III.	4	26	20,5	2		0,05	166,90	0,90	1,33	1,35	0,715	1,991	2,021	6,772
	2. III.			24,5	2										
11	3. III.	4	26	19,5	2		0,05	164,52	0,87	1,31	1,32	0,721	1,997	2,012	6,763
	4. III.			23,5	2										
12	5. III.	4	25	20	2			162,03	1,00	1,34	1,34	0,726	2,068	2,068	6,950
	6. III.			25	2		0,05								
	7. III.			25	2										
13	8. III.	4	26	20,5	2	—		157,08	0,97	1,30	1,30	0,726	2,070	2,070	6,958
											Mittelwert:	0,722	2,031	2,042	6,861
											Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %. + vermehrt, — vermindert:	— 6,60	—3,88	+2,87	+1,86

Die Ernährungsweise dieser Versuchsreihe ist derjenigen von A gleich. Außerdem wurde Phlorrhizin Tag über Tag subkutan injiziert. Die Menge betrug 0,05 g. Der erste Versuch begann erst 6 Tage nach der ersten Phlorrhizineinspritzung.

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Gek Rindfl. g	Futter: Pepton *Witte* Sic. g	Futter: Gek. Rindfl. g	Phlorrhizininjektion g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Kalorien pro kg und Stunde
D. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten.															
14	10. III.	4	27	20,5	2	10	0,05	168,36	0,87	1,81	1,71	0,768	2,693	2,545	8,618
	11. III.			24,5	2	10									
15	12. III.	4	26	20,2	2			168,39	1,09	1,76	1,78	0,718	2,619	2,649	8,876
	13. III.			25	2		0,05								
	14. III.			24	2	10									
16	15. III.	4	26	20,5	2		0,05	171,86	1,11	1,89	1,86	0,738	2,747	2,703	9,104
	16. III.			25	2	10									
17	17. III.	4	26	21	2		0,05	175,22	1,20	1,84	1,79	0,746	2,629	2,557	8,627
	18. III.			24,5	2	10									
18	19. III.	4	26	20	2			175,05	0,88	1,84	1,82	0,734	2,629	2,600	8,755
											Mittelwert:	0,740	2,663	2,610	8,796
											Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:	— 4,27	+26,04	+31,49	+30,58
											„ „ „ B, „ „ „	—11,06	+ 1,64	+14.12	+12,09
											„ „ „ C, „ „ „	+ 2,49	+31,12	+27,82	+28,20

\+ vermehrt, — vermindert.

1 Stunde vor Beginn des Versuchs erhalten die Ratten 10 g ausgekochtes Rindfleisch. Die Darreichung von Fleisch und Pepton, die Phlorrhizininjektionen, die zeitlichen Verhältnisse der Ausführung derselben erfolgten genau wie in der Versuchsreihe C.

Tabelle VII. Übersichtstabelle.

	Respirationsquotient	CO_2-Bildung	O_2-Bildung	Kalorienbildung
		pro kg und Stunde		
A. Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton ernährten Ratten. Mittelwert.				
Tier I	0,767	1,740	1,648	5,585
„ II	0,784	1,642	1,521	5,175
„ III	0,779	1,690	1,576	5,317
„ IV	0,793	2,222	2,037	6,931
„ V	0,759	2,006	1,919	6,492
„ VI	0,773	2,113	1,985	6,736
Mittelwert	0,776	1,902	1,781	6,039
B. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten Ratten. Mittelwert.				
Tier I	0,828	2,323	2,037	6,981
„ II	0,829	1,941	1,701	5,828
„ III	0,823	2,117	1,869	6,399
„ IV	0,839	2,534	2,193	7,532
„ V	0,823	2,343	2,068	7,085
„ VI	0,832	2,620	2,287	7,847
Mittelwert	0,829	2,313	2,026	6,945
Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %	+ 6,83	+ 21,61	+ 13,76	+ 15,00
C. Erhaltungsstoffwechsel der mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten. Mittelwert.				
Tier I	0,720	1,695	1,709	5,737
„ II	0,721	1,546	1,558	5,227
„ III	0,723	1,596	1,604	5,381
„ IV	0,728	1,923	1,920	6,457
„ V	0,727	1,920	1,917	6,445
„ VI	0,722	2,031	2,042	6,861
Mittelwert	0,724	1,785	1,792	6,018
Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %	— 6,70	— 6,15	+ 0,62	— 0,35
D. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Fleisch und Pepton gefütterten und mit Phlorrhizin vorbehandelten Ratten. Mittelwert.				
Tier I	0,740	2,269	2,226	7,502
„ II	0,747	1,922	1,875	6,329
„ III	0,737	1,977	1,948	6,565
„ IV	0,747	2,615	2,543	8,578
„ V	0,742	2,416	2,367	7,969
„ VI	0,740	2,663	2,610	8,796
Mittelwert	0,742	2,311	2,261	7,623
Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %	— 4,38	+ 21,50	+ 26,95	+ 26,23
Vergleich mit Versuch B, ausgedrückt in %	— 10,49	— 0,09	+ 11,60	+ 9,76
Vergleich mit Versuch C, ausgedrückt in %	+ 2,49	+ 29,47	+ 26,17	+ 26,67

Fortgesetzte Untersuchungen über den Einfluß von Fleischaufnahme je nach dem vorausgegangenen Ernährungszustand.

Von

Tateyoshi Honda.

[Aus dem Physiologischen Institut (Hallerianum) der Universität Bern.]

(Eingegangen am 26. September 1927.)

Mit 10 Abbildungen im Text.

In einer voraufgegangenen Arbeit[1] hatte ich gezeigt, daß die Wirkung von Fleischaufnahme auf den Grundumsatz tiefgehend dadurch modifiziert wird, daß die Versuchstiere (Ratten) vorher reichlich mit Fett ernährt werden. Während bei gewöhnlicher gemischter Laboratoriumsnahrung die bekannte, als spezifisch-dynamische Wirkung bezeichnete Steigerung des Umsatzes nach Aufnahme von Fleisch in ausgesprochener Weise auftrat, war sie entweder gar nicht oder in nur sehr verminderter Weise vorhanden, wenn die Tiere vorher mit Fett gefüttert worden waren. Diese Tatsache wirft ein neues Licht auf dasjenige, was als spezifisch-dynamische Wirkung bezeichnet wird. Sie gestattet aber — und auf diesen Gesichtspunkt legte meine vorher genannte Arbeit besonderen Nachdruck — auch einen Rückschluß auf den etwaigen Anteil der Leber an der genannten Erscheinung. Denn die Leber ist nachweislich bei Ratten nach voraufgegangener Fütterung mit einer fast ausschließlichen Fettnahrung tiefgehend verändert. Da nun in derjenigen Zeit, in welcher das zutage tritt, was man als spezifisch-dynamische Wirkung bezeichnet, die Zeit intensivster Arbeit der Leber infolge der Nahrungsaufnahme liegt, durfte die Annahme gemacht werden, daß möglicherweise ein geändertes Verhalten der Leber mit im Spiele sei. Es konnte sich natürlich nur um eine Annahme handeln, und ich habe keinen Zweifel darüber gelassen, daß weitere Untersuchungen erforderlich seien.

[1] *T. Honda,* diese Zeitschr. **185**, **173**, 1927.

Eine Untersuchung, die sich auf Grund der Ergebnisse meiner voraufgegangenen Arbeit als notwendig erwiesen hat, ist die Untersuchung der spezifisch-dynamischen Wirkung des Fleisches, wenn die Tiere mit einer Nahrung gefüttert werden, die sehr reich an Kohlehydraten ist. Ich habe diese Untersuchung auf Anregung von Prof. *Asher* ausgeführt.

Der Plan dieser Arbeit war der folgende:

In einer ersten Versuchsreihe (A) wurde der Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot und Milch gefütterten Ratten untersucht. Auf diese Reihe folgte eine zweite (B), in welcher die spezifisch-dynamische Wirkung von Fleisch bei der gleichen Grunddiät ermittelt wurde. Dies geschah auf die Weise, daß die Tiere wie zum Grundumsatzversuch vorbereitet wurden, aber ehe sie in die Respirationskammer kamen die in den Protokollen bemerkte Fleischmenge erhielten. In der nächsten Versuchsreihe (C) wurde der Grundumsatz bestimmt, während die Tiere eine Nahrung erhielten, die aus Brot, Milch und täglich 5 g Rohrzucker bestand. In der vierten Reihe (D) wurde schließlich die spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei dem letztgenannten Ernährungsregime ermittelt.

Die Respirationsversuche erfolgten nach der üblichen Methode des Berner Physiologischen Instituts. Die letzte Fütterung wurde 15 Stunden vor Beginn jedes Versuchs gereicht. Zur Prüfung der spezifisch-dynamischen Wirkung erhielten die Tiere 10 g ausgekochtes Fleisch, welches 1 Stunde vor Beginn des Versuchs gegeben wurde. Der Rohrzucker wurde in Lösung mittels einer Spritze in den Magen gegeben. Die dritte Versuchsreihe begann erst 5 bis 8 Tage nach dem Einsetzen der oben beschriebenen Diät. Die Resultate meiner Versuche habe ich in Form von 5 Kurven und 5 Abbildungen dargestellt. Die einzelnen Protokolle folgen am Schluß meiner Arbeit. Aus meinen Darstellungen geht hervor, daß bei allen 6 Versuchstieren eine spezifisch-dynamische Wirkung durch die Fleischaufnahme eintritt. Die Größe derselben ist verschieden erstens bei den einzelnen Tieren und zweitens je nachdem man die Kohlensäurebildung oder den Sauerstoffverbrauch zugrunde legt. Auch zeigt sich eine gewisse Beziehung zu der Größe des Grundumsatzes wenigstens in gewissen Versuchen. Bei solchen Versuchen, wo der Grundumsatz an und für sich schon hoch war, ist öfters die Steigerung des Grundumsatzes durch Fleischaufnahme geringer, als wenn der Grundumsatz etwas niedrig ist.

Bei den Ratten, welche mit Brot und Milch vorgefüttert wurden, ergab sich durchschnittlich eine Steigerung der Kohlensäureausscheidung nach Fleischaufnahme um 7,35 % und des Sauerstoffverbrauchs um 3,58 %. Die Kalorienbildung hob sich bei Fleischaufnahme durchschnittlich um 4,27 %. Überblickt man die Einzelversuche, so erkennt

man nicht unerhebliche Abweichungen von diesem Mittelwert. Nachdem die Tiere mit Brot und Milch und Extrazulagen von Rohrzucker gefüttert worden waren, betrug infolge von Fleischaufnahme die Vergrößerung der Kohlensäurebildung durchschnittlich 13,74 %, des Sauerstoffverbrauchs 7,43 %, der Kalorienbildung 7,85 %. Im großen und ganzen hatte demnach die Extrazufuhr von Kohlehydraten zur Folge, daß nach Aufnahme von Fleisch der Grundumsatz noch etwas mehr gesteigert wird. Ob man freilich großes Gewicht auf die konstatierten Unterschiede zu legen berechtigt ist, steht dahin. Denn die Schwankungen können als solche betrachtet werden, die sich innerhalb derjenigen Grenzen halten, die man beobachtet, wenn man zahlreiche Versuche über die Folgen der Aufnahme von Fleisch auf den Grundumsatz anstellt.

Als wesentlich betrachte ich die Feststellung in meiner Arbeit, daß ein recht großer und unverkennbarer Unterschied in der Wirkung von Fleischaufnahme auf die Erhöhung des Grundumsatzes eintritt gegenüber meiner voraufgegangenen Arbeit. Dort hatte die Ernährung mit Fett die spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches praktisch beseitigt. Eine mehr natürliche Ernährung und eine solche mit reichlichen Kohlehydraten läßt hingegen die spezifisch-dynamische Wirkung ausnahmslos deutlich zutage treten. Das, was ich hier genannt habe, ist tatsächliches Ergebnis. Ich gehe über das rein Tatsächliche hinaus, wenn ich die Annahme zur Diskussion stelle, daß der Unterschied möglicherweise darauf beruhe, daß bei beiden Ernährungsregimes die Leber in einem ganz anderen Zustande sich befindet. Das eine Mal handelt es sich — in der früheren Arbeit — um eine mit Fett infiltrierte Leber, das andere Mal aber um eine reichlich mit Glykogen gefüllte. Im Lichte solcher Erwägungen dürfen wohl meine Ergebnisse als Beiträge für einen möglichen Anteil der Leber an der spezifisch-dynamischen Wirkung der Fleischaufnahme bewertet werden.

Zusammengefaßt, sind die Ergebnisse der vorstehenden Arbeit die nachfolgenden:

1. Bei Fütterung von Ratten mit Brot und Milch tritt die spezifisch-dynamische Wirkung von Fleisch ausnahmslos deutlich hervor.

2. Wird noch reichlich Rohrzucker dieser Grundnahrung zugesetzt, so ist die spezifisch-dynamische Wirkung der Fleischaufnahme durchschnittlich noch etwas mehr gesteigert.

3. Diese Tatsachen gestatten, eine Beziehung zwischen dem Zustand der Leber und der spezifisch-dynamischen Wirkung des Fleisches herzustellen, namentlich mit Rücksicht darauf, daß bei Vorfütterung mit Fett die spezifisch-dynamische Wirkung von Fleisch mehr oder weniger verschwindet.

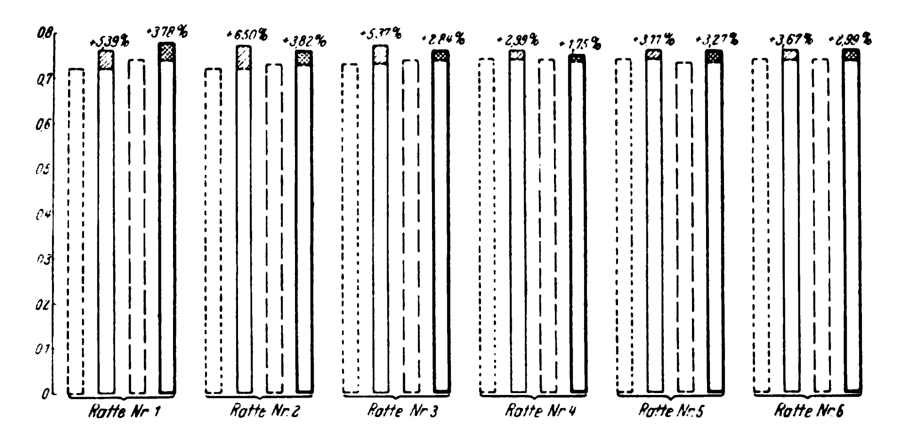


Abb. 1. Respirationsquotient.

- Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot und Milch gefütterten Ratten.
- Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot und Milch gefütterten Ratten.
- Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.
- Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.

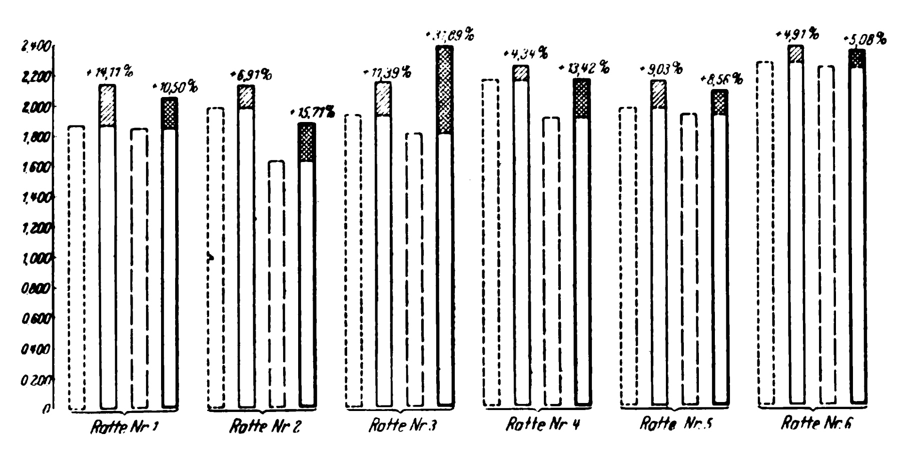


Abb. 2. CO_2 pro kg und Stunde.

- Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot und Milch gefütterten Ratten.
- Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot und Milch gefütterten Ratten.
- Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.
- Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.

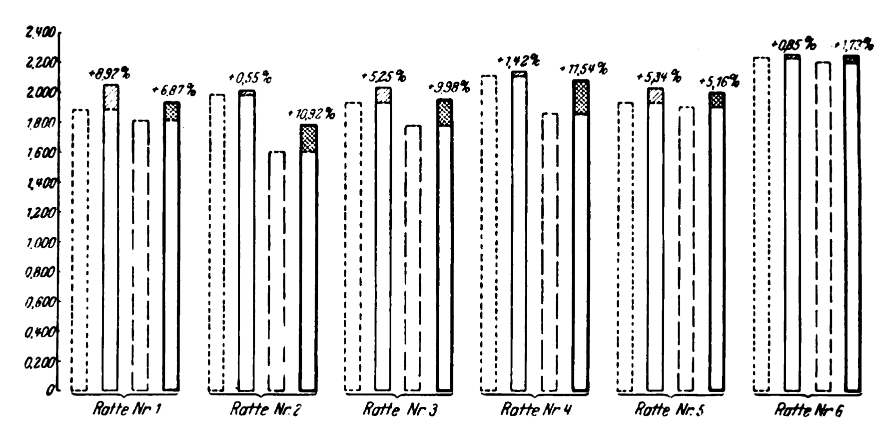


Abb. 3. O_2 pro kg und Stunde.

- **Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot und Milch gefütterten Ratten.**
- **Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot und Milch gefütterten Ratten.**
- **Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.**
- **Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.**

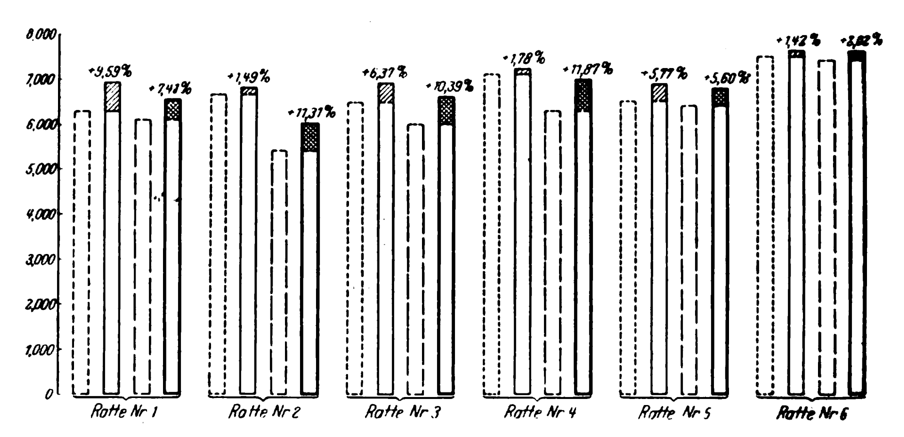


Abb. 4. Kalorienbildung pro kg und Stunde.

- **Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot und Milch gefütterten Ratten.**
- **Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot und Milch gefütterten Ratten.**
- **Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.**
- **Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.**

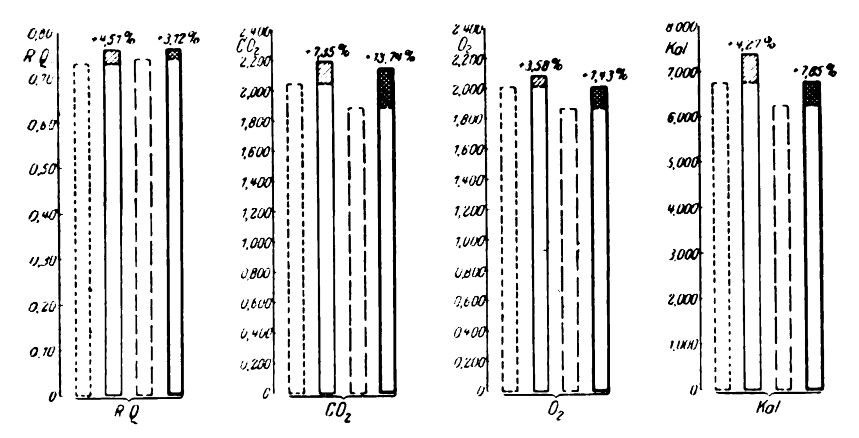


Abb. 5. Übersichtsabbildung.

Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot und Milch gefütterten Ratten.

Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot und Milch gefütterten Ratten.

Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.

Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.

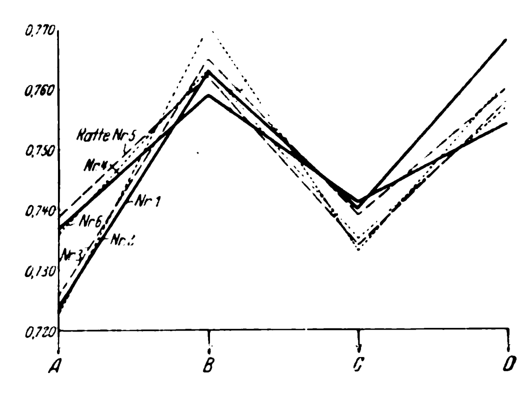


Abb. 6. Respirationsquotient.

A = Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot und Milch gefütterten Ratten.

B = Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot und Milch gefütterten Ratten.

C = Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.

D = Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.

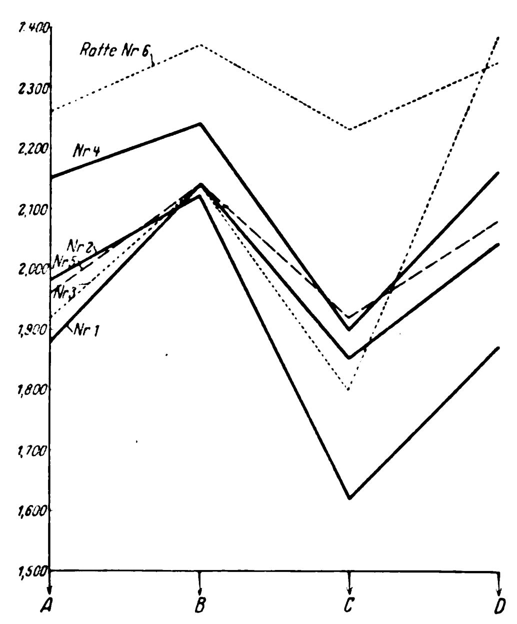


Abb. 7. CO_2 pro kg und Stunde.

A = Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot und Milch gefütterten Ratten.
B = Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot und Milch gefütterten Ratten
C = Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.
D = Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.

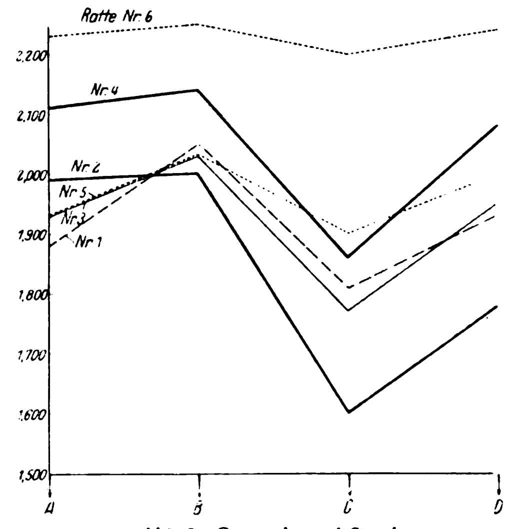


Abb. 8. O_2 pro kg und Stunde.

A = Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot und Milch gefütterten Ratten.
B = Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot und Milch gefütterten Ratten.
C = Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.
D = Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.

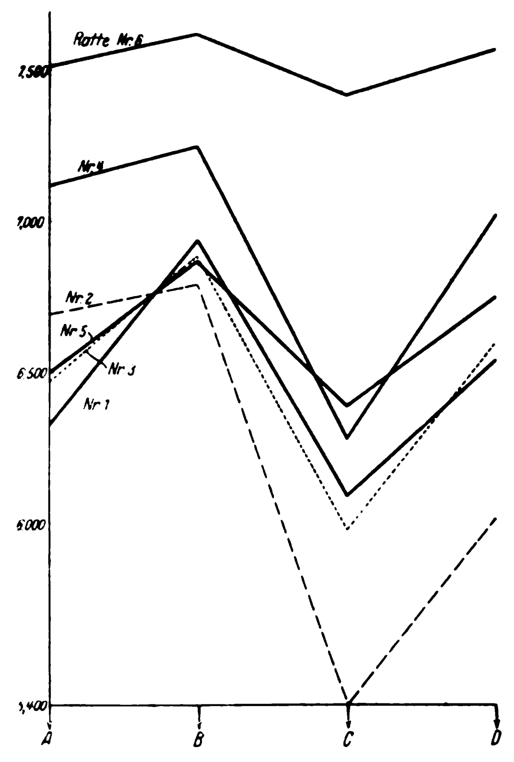


Abb. 9. Kalorienbildung pro kg und Stunde.

A = Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot und Milch gefütterten Ratten.
B = Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot und Milch gefütterten Ratten.
C = Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.
D = Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.

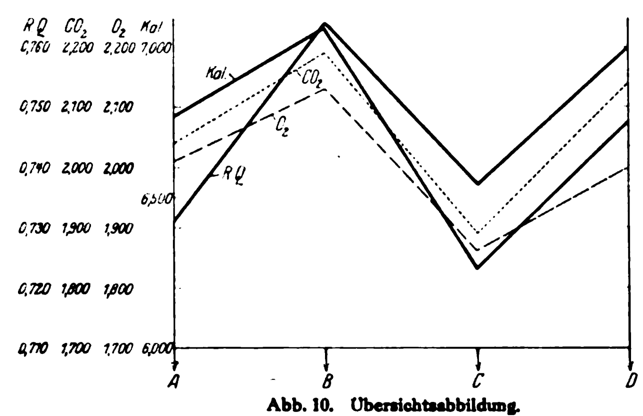


Abb. 10. Übersichtsabbildung.

A = Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot und Milch gefütterten Ratten.
B = Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot und Milch gefütterten Ratten.
C = Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.
D = Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.

Tabelle I.

Ratte Nr. 1. ♂.

Versuch	Datum	Versuchsdauer	Temperatur im Kasten	Futter			Körpergewicht	Totale H_2O-Bildung	Totale CO_2-Bildung	Totaler O_2-Verbrauch	Respirationsquotient	CO_2	O_2	Kalorien	Bemerkungen
				Brot und Milch	Rohrzucker	Fleisch						pro kg und Std.			
Nr.	1926	Std.	°C		g	g	g	g	g	g					
A. Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot und Milch gefütterten Ratten.															
1	18. XI.	4	25	Brot und Milch			174,99	1,10	1,33	1,33	0,726	1,911	1,911	6,423	Brot und Milch in mäßiger Menge gegeben. Versuch geschah in nüchternem Zustande. Die letzte Fütterung geschah 15 Std. vor dem Beginn des Versuchs.
2	25. XI.	4	26	Brot und Milch			179,19	1,20	1,35	1,36	0,721	1,885	1,899	6,384	
3	27. XI.	4	26	Brot und Milch			184,83	1,02	1,38	1,37	0,732	1,875	1,861	6,268	
4	30. XI.	4	26	Brot und Milch			193,21	1,02	1,39	1,40	0,721	1,801	1,813	6,095	
5	2. XII.	4	25	Brot und Milch			193,31	1,07	1,48	1,49	0,722	1,917	1,930	6,487	
										Mittelwert:	0,724	1,878	1,883	6,331	
B. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot und Milch gefütterten Ratten.															
6	7. XII.	4	27	Brot und Milch		10	210,24	0,90	1,98	1,70	0,846	2,357	2,024	6,958	Eine Stunde vor Beginn des Versuchs erhalten die Ratten 10 g Rindfleisch. Sonst ist die Ernährungsweise genau wie bei der Versuchsreihe A.
7	9. XII.	4	26	Brot und Milch		10	211,95	1,64	1,84	2,03	0,658	2,180	2,405	7,976	
8	11. XII.	4	26	Brot und Milch		10	214,18	1,47	1,80	1,67	0,783	2,103	1,951	6,633	
9	13. XII.	4	26	Brot und Milch		10	225,56	1,27	1,85	1,70	0,791	2,056	1,889	6,443	
10	15. XII.	4	26	Brot und Milch		10	218,84	1,38	1,76	1,73	0,739	2,018	1,984	6,681	
										Mittelwert:	0,763	2,143	2,051	6,938	
										Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:	+ 5,39	+ 14,11	+ 8,92	+ 9,59	

+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle I (Fortsetzung).

Versuch	Datum	Versuchsdauer	Temperatur im Kasten	Futter			Körpergewicht	Totale H_2O-Bildung	Totale CO_2-Bildung	Totaler O_2-Verbrauch	Respirationsquotient	CO_2	O_2	Kalorien	Bemerkungen
				Brot und Milch	Rohrzucker	Fleisch						pro kg und Std.			
Nr.	1926/27	Std.	°C		g	g	g	g	g	g					
	C. Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.														
11	20. XII.	4	26	Brot und Milch	5		208,09	1,19	1,64	1,63	0,727	1,971	1,959	6,585	Bei dieser Versuchsreihe erhalten die Ratten wie bei der Versuchsreihe A Brot und Milch, außerdem täglich 5 g Rohrzucker (mit einer Spritze per os). Die Versuche wurden im nüchternen Zustande ausgeführt. Die letzte Fütterung wurde 15 Std. vor dem Beginn des Versuchs gereicht. Der erste Versuch begann erst 5 Tage nach dem Beginn der oben beschriebenen Diät.
	21. XII.				5										
12	22. XII.	4	26		5		199,24	1,15	1,31	1,26	0,755	1,684	1,583	5,351	
	23. XII.				5										
13	24. XII.	4	26		5		196,60	1,19	1,48	1,45	0,741	1,888	1,849	6,240	
	25. XII.				5										
	26. XII.				5										
	27. XII.				5										
14	28. XII.	4	25		5		199,58	0,72	1,46	1,45	0,731	1,834	1,822	6,134	
	29. XII.				5										
15	30. XII.	4	26		5		197,86	1,19	1,41	1,38	0,742	1,789	1,751	5,909	
	31. XII.				5										
	1. I.				5										
	2. I.				5										
	3. I.				5										
16	4. I.	4	26		5		201,05	1,02	1,54	1,50	0,745	1,915	1,866	6,294	
										Mittelwert:	0,740	1,847	1,805	6,86	
										Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:	+ 2,21	— 1,65	— 4,14	— 3,87	

+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle I (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Brot und Milch	Futter: Rohrzucker g	Futter: Fleisch g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Std.	O_2 pro kg und Std.	Kalorien pro kg und Std.	Bemerkungen
D. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.															
17	6. I.	4	26	Brot und Milch	5	10	208,76	1,39	1,69	1,56	0,787	2,031	1,875	6,374	Eine Stunde vor Beginn des Versuches erhalten die Ratten 10 g Rindfleisch. Sonst ist die Ernährungsweise genau wie bei der Versuchsreihe C.
	7. I.				5										
18	8. I.	4	26		5	10	215,79	1,11	1,77	1,66	0,775	2,058	1,930	6,554	
	9. I.				5										
	10. I.				5										
19	11. I.	4	26		5	10	212,53	0,92	1,77	1,66	0,775	2,089	1,958	6,642	
	12. I.				5										
20	13. I.	4	26		5	10	210,44	1,25	1,69	1,60	0,767	2,021	1,905	6,451	
	14. I.				5										
21	15. I.	4	26		5	10	213,65	1,07	1,75	1,69	0,752	2,054	1,984	6,705	
	16. I.				5										
22	17. I.	4	26		5	10	212,31	1,35	1,70	1,63	0,758	2,005	1,922	6,498	
										Mittelwert:	0,768	2,041	1,929	6,537	
										Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:	+ 6,08	+ 8,68	+ 2,44	+ 3,25	
										„ „ „ B, „ „ %:	+ 0,66	+ 4,76	+ 5,95	+ 5,78	
										„ „ „ C. „ „ %:	+ 3,78	+ 10,50	+ 6,87	+ 7,41	

+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle II.

Ratte Nr. 2. ♂.

Versuch Nr.	Datum 1926	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Brot und Milch	Futter: Rohrzucker g	Futter: Fleisch g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Std.	O_2 pro kg und Std.	Kalorien pro kg und Std.	Bemerkungen
A. Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot und Milch gefütterten Ratten.															
1	18. XI.	4	25	Brot und Milch			175,34	0,96	1,45	1,47	0,716	2,071	2,100	7,037	Brot und Milch wurden täglich in mäßiger Menge gegeben. Versuch geschah in nüchternem Zustande. Die letzte Fütterung geschah 15 Stunden vor Beginn des Versuchs.
2	25. XI.	4	26				188,93	1,11	1,49	1,49	0,726	1,981	1,981	6,660	
3	27. XI.	4	27				188,49	1,16	1,44	1,44	0,726	1,915	1,915	6,436	
4	30. XI.	4	26				193,59	1,01	1,54	1,54	0,726	1,995	1,995	6,705	
5	2. XII.	4	26				202,63	1,21	1,58	1,59	0,722	1,955	1,968	6,614	
										Mittelwert:	0,723	1,983	1,992	6,690	
B. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot und Milch gefütterten Ratten.															
6	7. XII.	4	26	Brot und Milch		10	210,07	1,39	1,84	1,78	0,751	2,190	2,119	7,163	Eine Stunde vor Beginn des Versuchs erhalten die Ratten 10 g Rindfleisch. Sonst ist die Ernährungsweise genau wie bei Versuchsreihe A.
7	9. XII.	4	26			10	220,40	0,94	1,89	1,79	0,767	2,148	2,034	6,887	
8	11. XII.	4	26			10	230,94	1,11	1,87	1,80	0,755	2,033	1,956	6,614	
9	13. XII.	4	25			10	236,27	1,36	2,03	1,93	0,764	2,151	2,045	6,924	
10	15. XII.	4	27			10	250,25	1,13	2,08	1,86	0,812	2,080	1,860	6,358	
										Mittelwert:	0,770	2,120	2,003	6,790	
										Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:	+ 6,50	+ 6,91	+ 0,55	+ 1,49	

+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle II (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Datum 1926/27	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Brot und Milch	Futter: Rohrzucker g	Futter: Fleisch g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Std.	O_2 pro kg und Std.	Kalorien pro kg und Std.	Bemerkungen
C. Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.															
11	20. XII.	4	26	Brot und Milch	5		256,81	1,01	1,71	1,70	0,731	1,670	1,660	5,591	Bei diesen Versuchen erhalten die Ratten wie bei der Versuchsreihe A Brot und Milch, außerdem täglich 5 g Rohrzucker (mit einer Spritze per os). Die Versuche werden in nüchternem Zustande ausgeführt. Die letzte Fütterung wurde 15 Std. vor Beginn des Versuchs gereicht. Der erste Versuch begann erst 5 Tage nach Beginn der oben beschriebenen Diät.
	21. XII.				5										
12	22. XII.	4	26		5		250,81	0,97	1,57	1,54	0,741	1,570	1,540	5,196	
	23. XII.				5										
13	24. XII.	4	26		5		246,11	1,07	1,64	1,61	0,740	1,667	1,636	5,520	
	25. XII.				5										
	26. XII.				5										
	27. XII.				5										
14	28. XII.	4	25		5		250,98	1,09	1,62	1,63	0,722	1,620	1,630	5,479	
	29. XII.				5										
15	30. XII.	4	26		5		247,13	1,12	1,54	1,53	0,731	1,559	1,548	5,215	
	31. XII.				5										
	1. I.				5										
	2. I.				5										
	3. I.				5										
16	4. I.	4	26		5		254,69	0,94	1,64	1,63	0,731	1,614	1,604	5,403	
										Mittelwert:	0,733	1,617	1,603	5,401	
										Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:	+ 1,38	— 18,46	— 19,53	— 19,27	

\+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle II (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Brot und Milch	Futter: Rohrzucker g	Futter: Fleisch g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Std.	O_2 pro kg und Std.	Kalorien pro kg und Std.	Bemerkungen
	D. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.														
17	6. I.	4	26		5	10	262,79	1,54	1,98	1,78	0,808	1,889	1,699	5,795	Eine Stunde vor Beginn des Versuchs erhalten die Ratten 10 g Rindfleisch, sonst ist die Ernährungsweise genau wie bei der Versuchsreihe C.
	7. I.				5										
18	8. I.	4	26		5	10	274,15	1,18	1,94	1,85	0,762	1,770	1,688	5,717	
	9. I.			Brot und Milch	5										
	10. I.			Brot und Milch	5										
19	11. I.	4	26	Brot und Milch	5	10	275,81	0,99	2,09	2,03	0,748	1,900	1,845	6,226	
	12. I.			Brot und Milch	5										
20	13. I.	4	26	Brot und Milch	5	10	274,67	1,60	2,18	2,10	0,754	1,989	1,916	6,477	
	14. I.			Brot und Milch	5										
21	15. I.	4	26		5	10	282.41	1,43	2,10	2,02	0.755	1,862	1,791	6,054	
	16. I.				5										
22	17. I.	4	26		5	10	283,14	1,14	2,06	1,96	0,763	1,820	1,731	5,864	
										Mittelwert:	0,761	1,871	1,778	6,022	
										Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:	+ 5,26	— 5,65	—10,74	— 9,99	
										„ „ „ B, „ „ %:	— 1,17	—11,75	—11,25	—11,31	
										„ „ „ C, „ „ %:	+ 3,82	+15,71	+10,72	—11,31	

+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle III.

Ratte Nr. 3. ♂.

Versuch Nr.	Datum 1926	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Brot und Milch	Futter: Rohrzucker g	Futter: Fleisch g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Std.	O_2 pro kg und Std.	Kalorien pro kg und Std.	Bemerkungen
A. Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot und Milch gefütterten Ratten.															
1	16. XI.	4	25	Brot und Milch			222,42	1,57	1,75	1,75	0,726	1,971	1,971	6,624	Brot und Milch wurden in mäßiger Menge gegeben. Versuch geschah in nüchternem Zustande, die letzte Fütterung geschah 15 Std. vor Beginn des Versuchs.
2	18. XI.	4	26	Brot und Milch			213,85	1,11	1,71	1,72	0,722	2,007	2,019	6,785	
3	25. XI.	4	26	Brot und Milch			220,53	1,17	1,62	1,61	0,731	1,841	1,830	6,161	
4	27. XI.	4	27	Brot und Milch			214,42	1,23	1,59	1,59	0,726	1,857	1,857	6,243	
5	30. XI.	4	26	Brot und Milch			216,83	1,02	1,72	1,71	0,731	1,991	1,979	6,665	
6	2. XII.	4	26	Brot und Milch			218,94	1,32	1,63	1,65	0,718	1,869	1,892	6,340	
										Mittelwert:	0,726	1,923	1,925	6,470	
B. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot und Milch gefütterten Ratten.															
7	4. XII.	4	26	Brot und Milch		10	224,04	1,53	1,86	1,80	0,751	2,076	2,009	6,791	Eine Stunde vor Beginn des Versuchs erhalten die Ratten 10 g Rindfleisch. Sonst ist die Ernährungsweise genau wie bei Versuchsreihe A.
8	7. XII.	4	26	Brot und Milch		10	227,99	1,79	2,03	1,91	0,772	2,236	2,103	7,121	
9	9. XII.	4	26	Brot und Milch		10	235,53	1,47	2,05	1,96	0,760	2,181	2,085	7,062	
10	11. XII.	4	25	Brot und Milch		10	235,30	1,60	2,04	1,92	0,772	2,170	1,996	6,915	
11	13. XII.	4	26	Brot und Milch		10	240,12	1,39	1,97	1,89	0,757	2,052	1,969	6,655	
12	15. XII.	4	26	Brot und Milch		10	266,25	1,53	2,27	2,12	0,778	2,134	1,993	6,746	
										Mittelwert:	0,765	2,142	2,026	6,882	
										Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:	+ 5,37	+11,39	+ 5,25	+ 6,37	

\+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle III (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Datum 1926/27	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Brot und Milch	Futter: Rohrzucker g	Futter: Fleisch g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Std.	O_2 pro kg und Std.	Kalorien pro kg und Std.	Bemerkungen
C. Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.															
13	20. XII.	4	26	Brot und Milch	5		258,44	1,15	1,92	1,89	0,738	1,860	1,831	6,167	Bei dieser Versuchsreihe erhalten die Ratten wie bei der Versuchsreihe A Brot und Milch, außerdem täglich 5 g Rohrzucker (mit einer Spritze per os). Die Versuche werden im nüchternen Zustande ausgeführt. Die letzte Fütterung wurde 15 Std. vor Beginn des Versuchs gereicht. Der erste Versuch begann erst 5 Tage nach dem Beginn der oben beschriebenen Diät.
	21. XII.				5										
14	22. XII.	4	26		5		251,32	1,33	1,79	1,77	0,735	1,783	1,763	5,937	
	23. XII.				5										
15	24. XII.	4	26		5		245,09	1,03	1,75	1,70	0,748	1,786	1,735	5,853	
	25. XII.				5										
	26. XII.				5										
	27. XII.				5										
16	28. XII.	4	25		5		249,75	1,22	1,84	1,85	0,723	1,847	1,857	6,243	
	29. XII.				5										
17	30. XII.	4	26		5		250,47	1,14	1,75	1,70	0,748	1,750	1,700	5,736	
	31. XII.				5										
	1. I.				5										
	2. I.				5										
	3. I.				5										
18	4. I.	4	26		5		216,23	1,04	1,84	1,83	0,742	1,791	1,753	5,914	
Mittelwert:											0,739	1,803	1,773	5,975	
Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:											+ 1,79	— 6,24	— 7,90	— 7,65	

+ vermehrt. — vermindert.

Tabelle III (Fortsetzung).

Versuch	Datum	Versuchsdauer	Temperatur im Kasten	Futter			Körpergewicht	Totale H_2O-Bildung	Totale CO_2-Bildung	Totaler O_2-Verbrauch	Respirationsquotient	CO_2	O_2	Kalorien	Bemerkungen
				Brot und Milch	Rohrzucker	Fleisch						pro kg und Std.			
Nr.	1927	Std.	°C		g	g	g	g	g	g					
D. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.															
19	6. I.	4	26	Brot und Milch	5	10	268,94	1,69	2,29	2,21	0,753	2,136	2,062	6,969	Eine Stunde vor Beginn des Versuchs erhalten die Ratten 10 g Rindfleisch. Sonst ist die Ernährungsweise genau wie bei der Versuchsreihe C.
	7. I.				5										
20	8. I.	4	26		5	10	275,72	1,44	2,27	2,16	0,763	2,064	1,964	6,650	
	9. I.				5										
	10. I.				5										
21	11. I.	4	26		5	10	272,92	1,24	2,23	2,14	0,757	2,042	1,960	6,624	
	12. I.				5										
22	13. I.	4	26		5	10	274,15	1,09	2,22	2,10	0,768	2,026	1,916	6,489	
	14. I.				5										
23	15. I.	4	26		5	10	273,48	1,45	2,21	2,13	0,754	2,024	1,951	6,594	
	16. I.				5										
24	17. I.	4	26		5	10	279,36	1,08	2,16	2,06	0,762	1,935	1,846	6,252	
Mittelwert:											0,760	2,378	1,950	6,596	
Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:											+ 4,68	+23,66	+ 1,30	+ 1,95	
„ „ „ B, „ „ %:											— 0,65	+11,02	— 0,75	— 4,16	
„ „ „ C, „ „ %:											+ 2,84	+31,89	+ 9,98	+10,39	

+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle IV.

Ratte Nr. 4. ♂.

Versuch Nr.	Datum 1926	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Brot und Milch	Futter: Rohrzucker g	Futter: Fleisch g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Std.	O_2 pro kg und Std.	Kalorien pro kg und Std.	Bemerkungen
A. Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot und Milch gefütterten Ratte.															
1	17. XI.	4	26	Brot und Milch			142,28	1,26	1,25	1,23	0,738	2,201	2,165	7,292	Brot und Milch wurden tägl. in mäß. Menge gegeben. Versuch geschah in nüchtern. Zustande. Die letzte Fütterung geschah 15 Std. vor Beginn des Versuchs
2	19. XI.	4	26	Brot und Milch			150,88	0,99	1,28	1,28	0,732	2,133	2,117	7,128	
3	22. XI.	4	27	Brot und Milch			162,48	1,20	1,40	1,37	0,742	2,160	2,114	7,133	
4	24. XI.	4	26	Brot und Milch			163,09	1,20	1,41	1,39	0,737	2,163	2,132	7,179	
5	26. XI.	4	26	Brot und Milch			167,18	1,19	1,38	1,36	0,737	2,066	2,036	6,856	
										Mittelwert:	0,737	2,145	2,113	7,118	
B. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot und Milch gefütterten Ratten.															
6	29. XI.	4	25	Brot und Milch		10	170,58	1,11	1,49	1,44	0,752	2,191	2,118	7,159	Eine Stunde vor Beginn des Versuchs erhalten die Ratten 10 g Rindfleisch. Sonst ist die Ernährungsweise genau wie bei Versuchsreihe A
7	1. XII.	3	26	Brot und Milch		10	177,83	0,97	1,18	1,11	0,779	2,222	2,072	7,013	
8	3. XII.	4	26	Brot und Milch		10	174,91	1,14	1,59	1,51	0,765	2,284	2,170	7,348	
9	6. XII.	4	25	Brot und Milch		10	183,36	1,32	1,72	1,63	0,767	2,350	2,227	7,542	
10	8. XII.	4	26	Brot und Milch		10	181,03	0,97	1,55	1,54	0,731	2,141	2,127	7,163	
										Mittelwert:	0,759	2,238	2,143	7,245	
										Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:	+ 2,99	+ 4,34	+ 1,42	+ 1,73	

\+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle IV (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Datum 1926	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Brot und Milch	Futter: Rohrzucker g	Futter: Fleisch g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Std.	O_2 pro kg und Std.	Kalorien pro kg und Std.	Bemerkungen
				C. Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.											
11	21. XII.	4	26	Brot und Milch	5		181,93	1,22	1,44	1,40	0,747	1,989	1,934	6,524	Bei dieser Versuchsreihe erhalten die Ratten wie bei Versuchsreihe A Brot und Milch, außerdem täglich 5 g Rohrzucker (m. einer Spritze per os). Die Versuche werden in nücht. Zustande ausgeführt. Die letzte Fütterung wurde 15 Std. vor Beginn des Versuchs gereicht. Der erste Versuch begann erst 8 Tage nach Beginn d. oben beschrieb. Diät
	22. XII.				5										
12	23. XII.	4	26		5		180,78	1,45	1,43	1,40	0,742	1,986	1,945	6,550	
	24. XII.				5										
13	25. XII.	4	26		5		180,62	0,91	1,40	1,36	0,748	1,945	1,889	6,373	
	26. XII.				5										
14	27. XII.	4	26		5		178,74	1,09	1,24	1,21	0,744	1,742	1,700	5,734	
	28. XII.				5										
15	29. XII.	4	26		5		180,13	1,16	1,33	1,32	0,732	1,847	1,833	6,174	
	30. XII.				5										
16	31. XII.	4	26		5		180,83	1,16	1,36	1,35	0,732	1,889	1,875	6,314	
										Mittelwert:	0,741	1,900	1,863	6,278	
										Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:	+ 0,54	−11,42	− 11,83	− 11,80	

+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle IV (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Brot und Milch	Futter: Rohrzucker g	Futter: Fleisch g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Std.	O_2 pro kg und Std.	Kalorien pro kg und Std.	Bemerkungen
	D. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.														
17	3. I.	4	26	Brot und Milch	5	10	191,68	1,28	1,60	1,51	0,770	2,094	1,976	6,706	Eine Stunde vor Beginn des Versuchs erhalten die Ratten 10 g Rindfleisch. Sonst ist die Ernährungsweise genau wie bei Versuchsreihe C
	4. I.			Brot und Milch	5										
18	5. I.	4	26	Brot und Milch	5	10	187,84	0,95	1,60	1,58	0,736	2,139	2,112	7,113	
	6. I.			Brot und Milch	5										
19	7. I.	4	26	Brot und Milch	5	10	189,05	1,28	1,64	1,56	0,764	2,169	2,063	6,989	
	8. I.			Brot und Milch	5										
	9. I.			Brot und Milch	5										
20	10. I.	4	26	Brot und Milch	5	10	188,45	1,09	1,61	1,55	0,755	2,141	2,061	6,967	
	11. I.			Brot und Milch	5										
21	12. I.	4	26	Brot und Milch	5	10	185,15	1,04	1,62	1,57	0,750	2,189	2,122	7,172	
	13. I.			Brot und Milch	5										
22	14. I.	4	26	Brot und Milch	5	10	190,28	1,53	1,67	1,62	0,749	2,197	2,132	7,192	
										Mittelwert:	0,754	2,155	2,078	7,023	
										Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:	+ 2,31	+ 0,47	+ 1,66	− 1,33	
										„ „ „ B, „ „ %:	− 0,66	− 3,71	− 3,03	− 3,00	
										„ „ „ C, „ „ %:	+ 1,75	+ 13,42	+ 11,54	+ 11,87	

+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle V.

Ratte Nr. 5. ♂.

Versuch Nr.	Datum 1926	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Brot und Milch	Futter: Rohrzucker g	Futter: Fleisch g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Std.	O_2 pro kg und Std.	Kalorien pro kg und Std.	Bemerkungen
	A. Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot und Milch gefütterten Ratten.														
1	17. XI.	4	26	Brot u. Milch			159,06	0,95	1,28	1,26	0,738	2,013	1,981	6,671	Brot und Milch wurden tägl. in mäßiger Menge gegeben. Vers geschah in nüchtern. Zustande. Die letzte Fütterung geschah 15 Stunden vor Beginn des Versuchs
2	19. XI.	4	26	Brot u. Milch			163,79	1,10	1,31	1,28	0,743	2,009	1,963	6,624	
3	22. XI.	4	27	Brot u. Milch			165,66	1,18	1,29	1,30	0,721	1,955	1,970	6,620	
4	24. XI.	4	26	Brot u. Milch			169,23	1,28	1,30	1,25	0,755	1,923	1,849	6,251	
5	26. XI.	4	26	Brot u. Milch			168,52	1,09	1,28	1,26	0,738	1,905	1,875	6,314	
										Mittelwert:	0,739	1,961	1,928	6,496	
	B. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot und Milch gefütterten Ratten.														
6	29. XI.	4	25	Brot und Milch		10	175,33	0,93	1,41	1,38	0,742	2,014	1,971	6,651	1 Stunde vor Beginn des Versuchs erhalten die Ratten 10 g Rindfleisch. Sonst ist die Ernährungsweise genau wie bei Versuchsreihe A
7	1. XII.	4	26	Brot und Milch		10	177,34	1,32	1,45	1,37	0,769	2,048	1,935	6,554	
8	3. XII.	3	26	Brot und Milch		10	181,79	0,87	1,20	1,14	0,765	2,210	2,099	7,110	
9	6. XII.	4	25	Brot und Milch		10	177,39	1,34	1,56	1,49	0,761	2,203	2,105	7,128	
10	8. XII.	4	26	Brot und Milch		10	180,37	1,67	1,61	1,47	0,778	2,236	2,041	6,912	
11	10. XII.	4	26	Brot und Milch		10	182,65	1,05	1,54	1,48	0,706	2,115	2,033	6,872	
										Mittelwert:	0,762	2,138	2,031	6,871	
										Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:	+ 0,11	+ 9,03	+ 5,34	+ 5,77	

+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle V (Fortsetzung).

Versuch	Datum	Versuchsdauer	Temperatur im Kasten	Futter			Körpergewicht	Totale H_2O-Bildung	Totale CO_2-Bildung	Totaler O_2-Verbrauch	Respirationsquotient	CO_2	O_2	Kalorien	Bemerkungen
				Brot und Milch	Rohrzucker	Fleisch						pro kg und Std.			
Nr.	1926	Std.	°C		g	g	g	g	g	g					
C. Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.															
12	21. XII.	4	26	Brot und Milch	5		176,89	1,27	1,45	1,43	0,739	2,060	2,031	6,840	Bei dieser Versuchsreihe erhalten die Ratten wie bei Versuchsreihe A Brot und Milch, außerdem täglich 5 g Rohrzucker (m. einer Spritze per os). Die Versuche wurden in nücht. Zustande ausgeführt. Die letzte Fütterung wurde 15 Stunden vor Beginn des Versuchs gereicht. Der erste Versuch begann erst 8 Tage nach dem Beginn der oben beschriebenen Diät
	22. XII.				5										
13	23. XII.	4	26		5		175,05	1,17	1,36	1,39	0,711	1,943	1,986	6,654	
	24. XII.				5										
14	25. XII.	4	26		5		178,61	1,03	1,37	1,35	0,737	1,923	1,896	6,385	
	26. XII.				5										
15	27. XII.	4	25		5		177,27	0,69	1,27	1,23	0,750	1,794	1,737	5,873	
	28. XII.				5										
16	29. XII.	4	26		5		176,12	0,96	1,34	1,32	0,737	1,903	1,875	6,314	
	30. XII.				5										
17	31. XII.	4	26		5		181,88	0,85	1,36	1,35	0,732	1,878	1,865	6,279	
										Mittelwert:	0,734	1,917	1,898	6,391	
										Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:	— 0,68	— 2,24	— 1,56	— 1,62	

+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle V (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Brot und Milch	Futter: Rohrzucker g	Futter: Fleisch g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Std.	O_2 pro kg und Std.	Kalorien pro kg und Std.	Bemerkungen
	D. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.														
18	3. I.	4	26	Brot und Milch	5	10	192,81	0,93	1,51	1,48	0,741	1,966	1,927	6,502	Eine Stunde vor Beginn d. Versuchs erhalten die Ratten 10 g Rindfleisch. Sonst ist die Ernährungsweise genau wie Versuchsreihe C
	4. I.				5										
19	5. I.	4	26		5	10	194,55	0,79	1,62	1,54	0,764	2,088	1,985	6,721	
	6. I.				5										
20	7. I.	4	26		5	10	193,26	1,14	1,60	1,50	0,775	2,073	1,943	6,593	
	8. I.				5										
	9. I.				5										
21	10. I.	4	26		5	10	197,50	1,01	1,69	1,65	0,744	2,145	2,094	7,064	
	11. I.				5										
22	12. I.	4	26		5	10	198,74	1,30	1,72	1,64	0,762	2,172	2,071	7,014	
	13. I.				5										
23	14. I.	4	26		5	10	201,56	1,39	1,64	1,57	0,759	2,040	1,953	6,601	
										Mittelwert:	0,758	2,081	1,996	6,749	
					Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:						+ 2,57	+ 6,12	+ 3,53	+ 3,90	
					„ „ „ B, „ „ %:						— 0,52	— 2,67	— 1,72	— 1,78	
					„ „ „ C, „ „ %:						+ 3,27	+ 8,56	+ 5,16	+ 5,60	

+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle VI.

Ratte Nr. 6. ♂.

Versuch	Datum	Versuchsdauer	Temperatur im Kasten	Futter			Körpergewicht	Totale H_2O-Bildung	Totale CO_2-Bildung	Totaler O_2-Verbrauch	Respirationsquotient	CO_2	O_2	Kalorien	Bemerkungen
				Brot und Milch	Rohrzucker	Fleisch						pro kg und Std.			
Nr.	1926	Std.	°C		g	g	g	g	g	g					
A. Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot und Milch gefütterten Ratten.															
1	17. XI.	4	26	Brot u. Milch			125,05	1,17	1,12	1,10	0,739	2,240	2,200	7,410	Brot und Milch wurden tägl. in mäß. Menge gegeben. Vers. geschah in nücht. Zustande. Die letzte Fütterg. geschah 15 Stunden vor Beginn des Versuchs
2	19. XI.	4	26	Brot u. Milch			125,01	0,97	1,16	1,14	0,739	2,320	2,280	7,678	
3	22. XI.	4	27	Brot u. Milch			141,15	1,27	1,26	1,25	0,732	2,234	2,215	7,459	
4	24. XI.	4	26	Brot u. Milch			143,62	1,37	1,28	1,26	0,738	2,238	2,203	7,418	
5	26. XI.	4	26	Brot u. Milch			143,05	1,38	1,30	1,29	0,732	2,273	2,255	7,595	
										Mittelwert:	0,736	2,261	2,231	7,512	
B. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot und Milch gefütterten Ratten.															
6	29. XI.	4	25	Brot und Milch		10	155,54	1,29	1,47	1,39	0,768	2,371	2,242	7,593	Eine Stunde vor Beginn d. Versuchs erhalten die Ratten 10 g Fleisch. Sonst ist die Ernährungsweise genau wie bei Versuchsreihe A
7	1. XII.	4	26	Brot und Milch		10	159,33	1,34	1,57	1,49	0,766	2,406	2,280	7,722	
8	3. XII.	4	26	Brot und Milch		10	167,36	1,40	1,58	1,51	0,743	2,366	2,260	7,624	
9	6. XII.	4	25	Brot und Milch		10	167,95	1,66	1,58	1,50	0,765	2,366	2,245	7,605	
10	8. XII.	4	26	Brot und Milch		10	169,13	1,16	1,59	1,50	0,770	2,352	2,219	7,529	
11	10. XII.	4	26	Brot und Milch		10	174,56	1,25	1,65	1,57	0,763	2,371	2,256	7,640	
										Mittelwert:	0,763	2,372	2,250	7,619	
										Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:	+ 3,67	+ 4,91	+ 0,85	+ 1,42	

+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle VI (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Datum 1926	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Brot und Milch	Futter: Rohrzucker g	Futter: Fleisch g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Std.	O_2 pro kg und Std.	Kalorien pro kg und Std.	Bemerkungen
C. Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.															
12	23. XII.	4	26	Brot und Milch	5		171,55	1,33	1,54	1,52	0,736	2,251	2,222	7,483	Bei dieser Versuchsreihe erhalten die Ratten wie bei Versuchsreihe A Brot und Milch, außerdem täglich 5 g Rohrzucker (m. einer Spritze per os). Die Versuche werden in nücht. Zustande ausgeführt. Die letzte Fütterung wurde 15 Stunden vor Beginn des Versuchs gereicht. Der erste Vers. begann erst 8 Tage nach Beginn der oben beschriebenen Diät
	24. XII.				5										
13	25. XII.	4	26		5		169,42	0,86	1,42	1,41	0,732	2,101	2,086	7,024	
	26. XII.				5										
14	27. XII.	4	25		5		170,69	1,15	1,41	1,39	0,737	2,074	2,044	6,884	
	28. XII.				5										
15	29. XII.	4	26		5		167,92	0,80	1,56	1,53	0,741	2,335	2,290	7,727	
	30. XII.				5										
16	31. XII.	4	26		5		169,75	1,09	1,60	1,59	0,731	2,367	2,352	7,921	
										Mittelwert:	0,735	2,226	2,199	7,415	
										Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:	— 0,14	— 1,55	— 1,43	— 1,29	

+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle VI (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Datum 1927	Versuchsdauer Std.	Temperatur im Kasten °C	Futter: Brot und Milch	Futter: Rohrzucker g	Futter: Fleisch g	Körpergewicht g	Totale H_2O-Bildung g	Totale CO_2-Bildung g	Totaler O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Std.	O_2 pro kg und Std.	Kalorien pro kg und Std.	Bemerkungen
D. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten.															
17	3. I.	4	26	Brot und Milch	5	10	179,25	0,93	1,64	1,57	0,742	2,290	2,193	7,398	Eine Stunde vor Beginn d. Versuchs erhalten die Ratten 10 g Rindfleisch. Sonst ist die Ernährungsweise genau wie bei Versuchsreihe C
	4. I.				5										
18	5. I.	4	26		5	10	179,41	1,03	1,73	1,66	0,757	2,416	2,318	7,837	
	6. I.				5										
19	7. I.	4	26		5	10	181,85	0,90	1,74	1,64	0,771	2,403	2,265	7,686	
	8. I.				5										
	9. I.				5										
20	10. I.	4	26		5	10	185,20	1,14	1,75	1,67	0,761	2,365	2,257	7,643	
	11. I.				5										
21	12. I.	4	26		5	10	188,12	1,10	1,74	1,66	0,761	2,314	2,208	7,476	
	13. I.				5										
22	14. I.	4	25		5	10	187,54	1,14	1,68	1,63	0,749	2,246	2,179	7,352	
										Mittelwert:	0,757	2,337	2,237	7,565	
										Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %:	+ 2,88	+ 3,45	+ 0,27	+ 0,71	
										„ „ „ B, „ „ %:	— 0,79	— 1,39	— 0,53	— 0,71	
										„ „ „ C, „ „ %:	+ 2,99	+ 5,08	+ 1,73	+ 2,02	

+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle VII.

	Respirationsquotient	CO_2	O_2	Kalorienbildung
		pro kg und Std.		
A. Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot und Milch gefütterten Ratten. Mittelwert.				
Tier I	0,724	1,878	1,883	6,331
„ II	0,723	1,983	1,992	6,690
„ III	0,726	1,923	1,925	6,470
„ IV	0,737	2,145	2,113	7,118
„ V	0,739	1,961	1,928	6,496
„ VI	0,736	1,261	2,231	7,512
Mittelwert:	0,731	2,042	2,012	6,769
B. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot und Milch gefütterten Ratten. Mittelwert.				
Tier I	0,763	2,143	2,051	6,938
„ II	0,770	2,120	2,003	6,790
„ III	0,765	2,142	2,026	6,882
„ IV	0,759	2,236	2,143	7,245
„ V	0,762	2,138	2,031	6,871
„ VI	0,763	2,372	2,250	7,619
Mittelwert:	0,764	2,192	2,084	7,058
Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %	+ 4,51	+ 7,35	+ 3,58	+ 4,27
C. Erhaltungsstoffwechsel der mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten. Mittelwert.				
Tier I	0,740	1,847	1,805	6,086
„ II	0,733	1,617	1,603	5,401
„ III	0,739	1,803	1,773	5,975
„ IV	0,741	1,900	1,863	6,278
„ V	0,734	1,917	1,898	6,391
„ VI	0,735	2,226	2,199	7,415
Mittelwert:	0,737	1,885	1,857	6,258
Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %	+ 0,82	— 7,69	— 7,70	— 7,55
D. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei den mit Brot, Milch und Rohrzucker gefütterten Ratten. Mittelwert.				
Tier I	0,768	2,041	1,929	6,537
„ II	0,761	1,871	1,778	6,022
„ III	0,760	2,378	1,950	6,596
„ IV	0,754	2,155	2,078	7,023
„ V	0,758	2,081	1,996	6,749
„ VI	0,757	2,339	2,237	7,565
Mittelwert:	0,760	2,144	1,995	6,749
Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %	+ 3,97	+ 5,00	— 0,84	— 0,30
Vergleich mit Versuch B, ausgedrückt in %	— 0,52	— 2,17	— 4,27	— 4,38
Vergleich mit Versuch C, ausgedrückt in %	+ 3,12	+ 13,74	+ 7,43	+ 7,85

Über die Fällung des Magnesiumions durch Tropäolin 00 und die Anwendung dieser Reaktion zu seiner kolorimetrischen Bestimmung.

Von

Jan Zahradníček.

(Aus dem chemischen Institut der tierärztlichen Hochschule in Brünn, Tschechoslowakei.)

(Eingegangen am 30. September 1927.)

Im Jahre 1918 erschien in Paris ein Lehrbuch, Biologie de la Playe de Guerre, von *Delbet* und *Fiessinger* (1). Die Autoren führten dort die überraschende Entdeckung an, daß das Magnesiumion im Plasma Leucocyten anzieht und sie zur Phagocytose aktiviert.

Dieser Umstand, gesichert durch zahlreiche Beobachtungen an Kriegsverletzten, zeigt, daß $Mg^{\cdot\cdot}$ in einer engen Beziehung zur lebenden Zelle, d. h. zu den Leucocyten, steht. In der neueren Literatur blieb er bisher unbeachtet, selbst das vortreffliche Werk von *Zondek* (2), Elektrolyte, aus dem Jahre 1926, gibt über diese so spezifische Eigenschaft des $Mg^{\cdot\cdot}$ gar nichts an. Erst *Bečka* (3) und seine Mitarbeiter begannen, dieses Thema gründlich zu erforschen. Aus seinen Versuchen ergibt sich immer deutlicher die Bedeutung des $Mg^{\cdot\cdot}$, und zwar an unerwarteter Stelle, nämlich bei Infektion, Entzündung und Regeneration im Gewebe. Es zeigte sich, daß bei der Applikation eines Magnesiumpräparats in der Wunde die Exsudation und der Plasmazerfall aufhört und eine schnelle Regeneration beginnt; die Wunden sowie auch Entzündungsprozesse aller Art fangen an zu granulieren und rasch zu epithelisieren.

Nach den bisherigen Versuchen, bei denen es sich eher um eine qualitative Magnesiumwirkung handelte, wird es nötig sein, auch die quantitativen Verhältnisse zu studieren, das heißt: das Magnesium im Plasma und Gewebe unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen festzustellen.

Das Studium nach dieser Seite setzt allerdings voraus, eine Methodik der Magnesiumbestimmung genau zu beherrschen. Da sich biologische Arbeiten nicht auf die Bestimmung von einem oder zwei Fällen be-

schränken können, sondern eine große Anzahl Analysen verlangen, so kommt eine Methodik in Frage, die am einfachsten, schnellsten und feinsten in kleinen Materialmengen möglichst genaue Resultate ergibt.

Die bisher bekannten Methoden der Magnesiumbestimmung beruhen größtenteils auf dem Prinzip, das Magnesium als Tripelphosphat zu fällen.

Die Methoden gelten für Blutserum, Plasma und Blut: stets muß man das Eiweiß ausfällen. Als Fällungsmittel verwendet man am häufigsten Trichloressigsäure, die im Koagulat am wenigsten von Mineralstoffen adsorbiert. Weniger werden diese Eiweißkörper durch Veraschung beseitigt. Deshalb wollte ich auch prüfen, ob die Veraschung durch die Flamme für die direkte Magnesiumbestimmung wenigstens eine Verkürzung der Arbeitszeit ergeben wird.

1. Eigentliche Magnesiumbestimmung mittels Tropäolin 00.

Bečka stellte in seinen Arbeiten über das Magnesium fest, daß Tropäolin das Magnesiumion sehr empfindlich fällt. Bei der Durchsicht der Literatur fand ich, daß diese Methode vollkommen neu ist, und entschloß mich, sie gründlich zu studieren.

Die Tropäolinreaktion auf Magnesiumion hängt von folgenden Faktoren ab:

1. Konzentration des Magnesiums.
2. Zeitdauer der Reaktion.
3. Konzentration des Farbstoffes.
4. Reaktion des Mittelgrundes.
5. Anwesenheit verschiedener Salze.
6. Richtigkeit der Ablesung.

1. Die Konzentration des Magnesiums.

Zu den Versuchen bereitete ich eine Lösung von 10,13 g kristallisiertem Magnesiumsulfat in 1 Liter destillierten Wassers, so daß 1 ccm der Lösung 1 mg Mg enthielt. Diese Urlösung verdünnte ich noch zehnmal, so daß 1 ccm 0,1 mg Mg entspricht.

Darauf stellte ich eine 0,1%ige Tropäolinlösung her. Ich verrieb die abgewogene Menge von Tropäolin 00 in einer Schale mit heißem destillierten Wasser und füllte nach der Filtration die Lösung auf das richtige Volumen auf. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung durch das ausgeschiedene Tropäolin etwas trübe, so daß man sie noch einmal filtrieren mußte. Überdies gebrauchte ich noch eine konzentrierte Lösung von oxalsaurem Ammonium, 5%ige Oxalsäure und 10%ige Schwefelsäure.

Fernerhin hatte ich einen genügenden Vorrat an Eprouvetten von 16 mm Durchmesser aus reinem Glas ohne jeden Fehler von genau demselben Kaliber.

Den ersten Versuch führte ich folgendermaßen aus: In die Eprouvetten gab ich abgemessene Mengen Magnesium von 5 bis 0,1 mg, zwei Tropfen oxalsaures Ammonium, füllte alles zum gleichen Volumen mit destilliertem Wasser auf und färbte alles mit einem Tropfen Tropäolinlösung. Alle Eprouvetten bis zu 0,1 mg wiesen eine bedeutende Abschwächung des gelben Tones auf, der Magnesiummenge entsprechend.

Eine ähnliche Reihe Versuche machte ich mit einer Verdünnung von 0,1 bis 0,01 mg Mg und stellte fest, daß die Intensität der Verfärbung ins Gelbliche mit der Konzentrationsverkleinerung zunimmt. Da bei den stärkeren Konzentrationen die Zeit der Verfärbung länger andauerte, mußte ich noch prüfen, ob die Verfärbung ein bestimmtes Maximum erreicht, oder ob sie überhaupt nicht konstant ist.

Die Empfindlichkeit der Reaktion prüfte ich noch derart, daß 0,5 mg Mg zu verschiedenen Mengen von 0,5 bis 5,0 ccm destillierten Wassers gegeben wurden, mit der gleichen Menge Farbstoff gefärbt und nach 30 Minuten auf ein gleiches Volumen aufgefüllt. Noch in der letzten Verdünnung war die Reaktion wahrnehmbar und gewann die gleiche Intensität wie in dem konzentrierten Mittelgrunde.

Daraus kann man schließen, daß noch 0,01 mg Mg in 1 ccm Lösung durch Tropäolin, sogar in Anwesenheit von oxalsaurem Ammonium, nachweisbar ist.

2. *Die Zeitdauer der Reaktion.*

Da in dieser Richtung einige Variationen vorlagen, untersuchte ich die Wirkung der Zeit genau. In einigen Eprouvetten mit den Konzentrationen 1,0, 0,5, 0,1, 0,05 mg Mg führte ich dieselben Reaktionen wie zuerst aus, und diese neue Serie färbte ich einige Male immer nach 10 Minuten. Bei Mengen bis zu 0,1 mg Mg färbt Tropäolin schon in einigen Minuten, und diese Verfärbung ist sogar einige Tage konstant. Je geringer die Magnesiummenge ist, um so länger dauert es, bis die Verfärbung konstant bleibt. Bei Mengen unter 0,05 mg Mg in 1 ccm Lösung erreicht die Reaktion in 30 Minuten das Maximum der Verfärbung, das einige Tage im Lichte oder im Dunkeln unverändert bleibt. Diesen Umstand erachte ich für sehr wichtig, da man sich so eine konstante Skala für die Tropäolinreaktion bereiten kann.

3. *Die Konzentration des Farbstoffs.*

Bereits in früheren Versuchen bemerkte ich, daß bei höheren Magnesiumkonzentrationen fast aller Farbstoff gefällt wurde, so daß zwischen 1,0 und 2,0 mg Mg keine sichtbare Differenz war. Dafür war der Unterschied zwischen 0,5, 0,05 und 0,04 mg Mg bei demselben Versuch frappant. Ich schloß daraus, daß das Magnesium den Farbstoff fällt und daß ein bestimmtes Verhältnis zwischen dem Magnesiumgehalt und Tropäolin innegehalten werden muß.

In weiteren Versuchen fällte ich 0,1 mg Mg mit steigenden Mengen Tropäolin. Es zeigte sich, daß von 0,2 ccm Tropäolin an jede weitere Menge Tropäolin eine intensive Verfärbung verursacht, oder, daß daher auf 0,1 mg Mg 0,2 ccm Tropäolin verbraucht werden. Ein zu großer Überschuß an Farbstoff ist nicht zum Vorteil der Reaktion, da dann die Aufhellung nicht sichtbar ist. Gleichfalls hindert eine zu geringe Menge die Genauigkeit der Reaktion.

4. *Die Reaktion des Mittelgrundes.*

Tropäolin 00 ist ein ziemlich guter Indikator auf Anwesenheit von Säuren. Die gelbe Farbe bleibt unverändert bei einer Reaktion bis $p_H = 7{,}0$; von p_H 6,0 an tritt ein rötlicher Ton auf, der bei p_H 4,0 karminrot bleibt. Diese Eigenschaft ließe sich auch beim Vergleich der Magnesiummengen ausnützen, da die roten Farbtöne markanter sind, man müßte jedoch den Vergleich bei konstantem p_H durchführen.

Um den Einfluß der Reaktion (p_H) bei der Magnesiumfällung mit Tropäolin zu prüfen, führte ich eine Reihe von Versuchen mit konstanten Mengen (0,1 mg) Mg folgendermaßen aus: In die erste Eprouvette gab ich einen Tropfen konzentrierten Ammoniaks, in die zweite fünf Tropfen 10%iges, in die dritte einen Tropfen desselben, in die vierte nichts, in die fünfte einen Tropfen Oxalsäure, in die sechste fünf Tropfen derselben, in die siebente zwei Tropfen Schwefelsäure und in die achte zehn Tropfen derselben. Dann fügte ich gleiche Mengen Tropäolin hinzu, nach 1 Stunde wurden die sauer reagierenden Eprouvetten mit Ammoniak neutralisiert und alle auf ein gleiches Volumen aufgefüllt.

Der Erfolg war, daß an beiden Enden der Reihe überhaupt keine Reaktion eintrat; je näher dem Neutralpunkt, desto größer war die Aufhellung, die ihr Maximum bei p_H 7,0 erreicht. Es ist daher klar, daß bei neutraler bis ein wenig alkalischer Reaktion (p_H 7,5) Magnesium durch Tropäolin am besten gefällt wird. Die Kontrolle des p_H erfolgte durch den Universalindikator B. D. H.

5. *Die Anwesenheit verschiedener Elektrolyte bei der Reaktion.*

In eine Reihe Eprouvetten gab ich Lösungen von Calcium-, Barium- und Strontiumsalzen, fügte überall drei Tropfen Tropäolin hinzu und verdünnte alle Lösungen auf ein gleiches Volumen. $Ca^{\cdot\cdot}$ wies eine ähnliche Reaktion auf wie $Mg^{\cdot\cdot}$; während aber bei der Magnesiumreaktion die Farbintensität nachläßt, bis ein bestimmter Farbton erreicht ist, bleibt bei der Calciumreaktion die Farbtiefe unverändert. Eine eigenartige Erscheinung zeigt sich bei Anwesenheit von Sulfaten. Calciumsulfat (Gipswasser) fällt Tropäolin recht stark; sobald man aber die Lösung auf ein Volumen von etwa 5 ccm verdünnt, löst sich das gesamte ausgefällte Tropäolin innerhalb 10 Minuten auf und die Farbintensität stimmt mit der Kontrolle überein. Barium und Strontium üben keinen sichtbaren Einfluß auf Tropäolin aus.

Alsdann prüfte ich in ähnlicher Weise Sulfatlösungen von Zink, Aluminium, Eisen und stellte dabei fest, daß Tropäolin mit diesen überhaupt nicht reagiert. Die Alkalisalze Kalium-, Natrium- und Ammoniumchlorid geben mit Tropäolin gar keine Reaktion bis zu einer Konzentration von 5%. Oberhalb dieser Konzentration wird Tropäolin 00 bereits ausgesalzen. Sulfate üben eine ähnliche Wirkung aus. Ich untersuchte ferner, welche Rolle die Gegenwart alkalischer Phosphate bei der $Mg^{\cdot\cdot}$-Fällung spielt, und stellte fest, daß diese von sich aus ohne Wirkung auf Tropäolin sind.

Sodann studierte ich den Einfluß der oben angegebenen Salze auf die Fällung von $Mg^{\cdot\cdot}$ mit Tropäolin. Die Alkalisulfate Na_2SO_4 und $(NH_4)_2SO_4$ in 1%iger Lösung hemmen den Reaktionsverlauf; K_2SO_4 aber fast gar nicht. Daher prüfte ich quantitativ den Einfluß der Alkalisulfate auf die Reaktion des Tropäolins mit Magnesium und fand, *daß sich bei Anwesenheit von 1% dieser Salze mit Hilfe dieser Reaktion $^1/_{100}$ mg Magnesium*

noch deutlich nachweisen läßt. Je geringer jedoch der Salzzusatz ist, desto empfindlicher ist die Reaktion; in reinen Magnesiumlösungen gibt noch 0,001 mg Mg einen so deutlichen Unterschied wie 0,01 mg in Gegenwart von Salzen. Dabei konnte wieder bestätigt werden, daß Kaliumsulfat die Reaktion nicht so hemmt wie äquivalente Ammonium- und Natriumlösungen.

Die Anwesenheit von $Ca^{··}$ stört die Reaktion überhaupt nicht, weil nach der Verdünnung der Flüssigkeit auf 5 ccm das durch Calcium gefällte Tropäolin sich löst. Überdies suchte ich den Einfluß von $Ca^{··}$ so auszuschalten, daß ich der Lösung etwas Ammoniumoxalat zufügte, wodurch das Calcium ausgefällt wurde. Im Filtrat oder Zentrifugat waren dann Hundertstel Milligramme $Mg^{··}$ gut erkennbar. Je größer der Zusatz von oxalsaurem Ammonium, desto schwächer ist die Fällung des Tropäolins mit Magnesium.

Zink, Aluminium und auch Eisen verhindern die Reaktion im allgemeinen nicht, obwohl bei zu konzentrierten Lösungen des dreiwertigen Eisens die Färbung eine genaue Ablesung unmöglich macht.

6. *Die Genauigkeit der Ablesung.*

Für die richtige Ablesung ist es vor allem notwendig, daß die Lösungen vollkommen klar sind. Eine noch so schwache Trübung verringert die Genauigkeit der Farbenabschätzung. Die gelben Farbtöne differenzieren sich sehr gut, wenn man die Eprouvetten gegen gelbes Glas oder gelbes eventuell einigemal umgelegtes Gelatinepapier betrachtet. Man erreicht hierdurch eine so große Empfindlichkeit, daß man 0,2 ccm Tropäolin in Lösungen von 5, 7 und 9 ccm Wasser deutlich unterscheidet. Eine derart eingerichtete Skala ist vollkommen beständig, und man kann sie zum Vergleich der Tropäolinreaktionen mit Magnesium gebrauchen. So stellte ich fest, daß in Anwesenheit einer größeren Menge von Alkalisalzen 0,01 mg $Mg^{··}$ ein bis zwei Stufen entspricht; sind die Salze nicht zugegen, gleicht eine Stufe 0,001 mg Magnesium.

Zur Feststellung der Farbtöne verwendete ich das Kolorimeter von *Duboscq*; man erzielt ganz leicht eine Genauigkeit von 0,5 mm und kann es auch anstatt der Skala gebrauchen. Die Differenzen zwischen den einzelnen Hundertsteln betragen bei richtiger Ausführung der Versuche einige Millimeter und sind ganz regelmäßig. Man kann eine Standardlösung von 0,2 ccm Tropäolin in 5 ccm Wasser zum Vergleich der Reaktionen benutzen. Ein Nachteil dieser Arbeitsweise liegt aber darin, daß man bei jeder weiteren Reaktion das Gefäß aus dem Apparat immer sorgfältig reinigen und austrocknen muß. Bequemer ist das Arbeiten mit dem Kolorimeter von *Autenrieth*: Man füllt das Reserveprisma mit einer Lösung von 0,2 ccm Tropäolin in 5 ccm Wasser, und in das Gefäßchen gibt man die klare Reaktionslösung nach der Magnesiumfällung. Auch hier gibt sich 0,01 mg Mg als eine Differenz von wenigstens 1 mm zu erkennen.

2. Einige Versuche zur praktischen Anwendung der Tropäolin-Magnesiumreaktion.

Aus den durchgeführten Versuchen ergibt sich, daß man die Tropäolinreaktion auch zur genauen quantitativen Magnesiumbestimmung im Plasma und Körperflüssigkeiten anwenden kann. Es ist erwiesen, daß man mit Tropäolin 0,001 mg Mg deutlich nachweisen kann, wenn die

Reaktion bei p_H etwa = 7,0 durchgeführt wird und wenn möglichst wenig andere Salze zugegen sind.

Ich unternahm einige Versuche und bemühte mich, die Bedingungen möglichst genau auszuarbeiten.

Versuche.

In einige Porzellantiegel wog ich gleiche Mengen von etwa 1 g defibrinierten Blutes ein und suchte die beste Art der Veraschung zu ermitteln.

1. Der Tiegel mit Blut wurde im Trockenschrank bei 110° getrocknet und darauf die Veraschung sorgfältig am Bunsenbrenner ausgeführt. Das Trocknen dauerte etwa 30 Minuten, das Veraschen ebensolange, wobei ich den Tiegel zweimal abkühlen ließ und die verkohlten Reste mit destilliertem Wasser bespritzte, wiederum trocknete und bis zur Weißglut erhitzte, so daß sich die Veraschung auf fast 2 Stunden erstreckte.

2. Das Trocknen erfolgte auf einer elektrischen Heizfläche bei etwa 120°; nach 10 Minuten bildete sich im Tiegel eine trockene Haut, worauf ich den Tiegel in einen elektrischen Tiegelofen stellte, der allmählich zum Glühen gebracht wurde. Bereits nach 20 Minuten erhielt ich eine feine, graue Asche, die ich nach dem Abkühlen mit Wasser bespritzte und nochmals ausglühte, worauf sie weiß wurde und nur stellenweise von Eisen rostig gefärbt war.

3. Nachdem das Blut auf der Heizplatte getrocknet war, gab ich in den Tiegel drei Tropfen konzentrierte Schwefelsäure und verglühte die Mischung allmählich über dem Bunsenbrenner, worauf ich bereits nach 30 Minuten eine weiße, etwas rötliche Asche erhielt.

4. Die Schwefelsäure gab ich sofort zum rohen Blute hinzu und rührte die Mischung durch, worauf sie schwarz wurde; alsdann trocknete ich die Mischung 10 Minuten auf der Heizplatte und glühte sie während 15 Minuten im Tiegelofen, was zur vollkommenen Veraschung genügte.

Aus den Versuchen sieht man, daß die schnellste und ökonomischste Veraschung diejenige des letzten Versuches ist; ich wende sie daher bei meiner weiteren Arbeit an.

Bei dieser Mineralisierungsmethode hinterbleiben in der Asche Alkalisulfate (K, Na) sowie Sulfate der Erdalkalien (Ca, Mg), die anderen Metalle bleiben als Oxyde zurück (Fe_2O_3, Al_2O_3, CuO usw.). Diese Methode könnte daher auch als eine gute Art der Trennung des Magnesiums von den anderen Metallen, außer von Alkali, dienen.

Mit Hilfe der Tropäolinreaktion führte ich eine Reihe von Versuchen aus: Porzellantiegel von etwa 10 ccm Inhalt wurden gewogen, das zu prüfende Serum oder Blut hinzugefügt und wiederum gewogen. Bei den ersten Versuchen erfolgte die Wägung mit einer Genauigkeit von Milligrammen, aber während der Arbeit stellte ich fest, daß das Abwägen auf einer empfindlichen Apothekenwage auf $\pm$ 0,01 g bei 1 bis 2 g Material eine mehr als ausreichende Genauigkeit darstellt, denn durch das Abwägen wird ein Fehler von etwa 1% hervorgerufen, während die empfindlichste Methode von *Kramer-Tisdall* mit einem Fehler von mindestens 5% arbeitet. Zum Material wurden zwei bis drei Tropfen konzentrierter Schwefelsäure zugefügt. Eine größere Menge zuzugeben, ist überflüssig, denn dadurch beschleunigt man die Arbeit schon nicht mehr. Nach gründlichem Durchmischen stellte ich die Tiegel auf eine bis 110° erhitzte elektrische Heizplatte,

wobei die Mischung schwarz und dünnflüssig wurde. Nach Erhöhung der Temperatur tritt bald Verkohlung ein, wonach der Tiegel zuerst an der milden, dann an der scharfen Flamme oder im Tiegelofen geglüht wird. Auf diese Weise erhielt ich aus dem Blute die Asche etwas rostig gefärbt, aus dem Plasma und Serum vollkommen weiß.

Zunächst suchte ich die Gegenwart von Mg˙˙ durch Tropäolin direkt festzustellen, und zwar auf folgende Weise:

Zu den Aschen gab ich etwa 1 ccm destilliertes Wasser und mischte alles mit einem am Ende mit einer dickwandigen Kautschukröhre versehenen Glasstäbchen, damit man die Mischung gut reiben kann. Dann goß ich die Mischung in die Eprouvetten aus und spülte noch zweimal den Tiegel aus. Darauf setzte ich Tropäolin zu, verdünnte auf 5 ccm und ließ die Mischung 24 Stunden stehen. Am zweiten Tage verglich ich die Nuancen mit der Standardskala und stellte fest: Überall, bereits von ½ g an bis 2 g Material, bemerkt man eine Abschwächung der Farbintensität, aber die genaue Ablesung wird in einigen Eprouvetten durch eine ständige Trübung verhindert, die sich weder durch Sedimentation noch durch Zentrifugieren beseitigen läßt. Beim Filtrieren fand ich, daß auf dem Filter auch ein Teil des Farbstoffs bleibt, so daß eine unregelmäßige Aufhellung der Lösung entsteht.

Tiegel Nr. I	II	III	IV	V
16,647 g	15 967 g	16,67 g	15,65 g	16,37 g
17,791 g	16 985 g	17,67 g	17,69 g	19,49 g
1,144 g	1,018 g	0,99 g	2,04 g	3,11 g

Die Aufhellung gegenüber der Kontrolle beträgt bei den ersten drei Proben etwa 1°, bei der vierten mehr, bei der fünften am meisten. Eine exakte Ablesung war jedoch wegen der dauernden Trübung nicht möglich.

Versuch zur Beseitigung der Trübung.

Da sich die Trübung als ein so erschwerender Umstand erwiesen hatte, suchte ich sie dadurch zu beheben, daß ich in einer Reihe neuer Proben die Asche in Wasser und oxalsaurem Ammonium löste, die Mischung filtrierte, dreimal mit einem gleichen Quantum Wasser durchspülte, das Filtrat auf einer schwach erwärmten Heizplatte eindampfte und dann glühte. Den Rückstand löste ich nochmals in wenig Wasser, zentrifugierte bzw. filtrierte die Lösung und brachte sie in die Eprouvetten zur Tropäolinreaktion. Diese wurde wie oben angegeben ausgeführt. Es resultierten wirklich klare Lösungen, die eine genauere Ablesung bis zum dritten Grade der Skala erlaubten.

In dieser Modifikation ermöglichte die Methode daher eine Abschätzung der Magnesiumanwesenheit in Grenzen von 0,01 mg Mg.

Versuche zur Erhöhung der Empfindlichkeitsgrenze der Tropäolinreaktion.

In weiteren Versuchen suchte ich das Verfahren zu verbessern. Vor allem liegt wohl der Fehler darin, daß zu geringe Mengen Magnesium in zu großer Verdünnung mit Tropäolin eine hinreichend deutliche Reaktion nicht geben können. Ich stellte mir nun eine Lösung von Magnesiumsulfat

her, die in 1 ccm 0,01 mg Mg enthielt. In eine Eprouvette gab ich 1 ccm dieser Lösung, in die andere 1 ccm einer zehnmal stärkeren Lösung. Zu beiden setzte ich 0,2 ccm Tropäolin hinzu, vermischte den Inhalt und verdünnte nach $^1/_4$ Stunde auf 5 ccm. Beim Vergleich der Farbtöne konnte ich überhaupt keine Differenz feststellen.

Der Versuch wurde so wiederholt, daß zur gleichen Menge Wasser stets kleinere Mengen Magnesium gegeben wurden, bis man wirklich sah, daß bei 0,005 mg Mg auf 1 ccm Wasser noch eine genaue Reaktion eintritt. In größerer Verdünnung (schon in 2 ccm) fällt das Magnesium aber nicht vollkommen, so daß die Eprouvette dunkler bleibt.

Weiter bemerkte ich, daß die Farbtöne sich ändern, wenn diese Eprouvetten nach der Verdünnung 24 Stunden stehen bleiben: Die Gläser mit den konzentrierteren Lösungen werden ein wenig, aber doch sichtlich dunkler, die Gläser mit den schwächeren Konzentrationen werden heller, wodurch sich die anfängliche Differenz vermindert; ein voller Ausgleich erfolgt jedoch nicht.

Auf Grund dieser Versuche kam ich zu der Überzeugung, daß sich $Mg^{\cdot\cdot}$ in der Organasche besser feststellen läßt, wenn man zum Auslaugen der Asche möglichst wenig Flüssigkeit verwendet, um die Magnesiumkonzentration möglichst hoch zu halten. Infolgedessen gab ich das Tropäolin direkt in die Tiegel, nämlich nach dem Durchmischen der Asche mit ½ ccm Wasser; ich ließ es darauf 1 Stunde stehen, verdünnte auf 5 ccm, vermischte wieder und goß nach 1 Stunde in die Eprouvetten zum Vergleich der Farbnuancen aus. Die Trübung entfernte ich entweder durch Zentrifugieren oder durch Sedimentation. Es zeigte sich, daß in den so behandelten Proben die Trübung fast vollkommen verschwand und die Resultate auch besser waren.

Tiegel Nr. I	II	III
10,90 g	11,62 g	12,68 g
12,30 g	13,56 g	15,50 g
1,40 g	1,94 g	2,82 g

Die Asche wurde mit ½ ccm Wasser behandelt, dazu 0,2 ccm Tropäolin gegeben, nach ½ Stunde auf 5 ccm verdünnt, nach abermals 30 Minuten ein Teil abzentrifugiert und ein Teil filtriert. Nach der Skala hat die erste Probe 1,2°, die zweite Probe 1,5° und die dritte Probe 1,8°.

Quantitative Bestimmung des Magnesiums mit Hilfe der Tropäolinreaktion nach dem Prinzip von Lorber.

Unter Vernachlässigung der bereits erwähnten Verbesserung untersuchte ich noch die Tropäolinreaktion zur quantitativen Bestimmung des Magnesiums in der Asche von Körperflüssigkeiten.

Man kann die Asche in zwei gleiche Portionen teilen, zur einen eine bestimmte Menge Magnesium geben, die andere ohne Zusatz lassen, die Tropäolinreaktion ausführen und die den beiden Teilen entsprechenden Farbnuancen ablesen. In Graden unserer Skala ausgedrückt, stellen wir in der Differenz zwischen den beiden Proben fest, wieviel Graden die zugegebene Menge Magnesium entspricht. Auf diese Weise läßt sich unsere

Skala kalibrieren, denn hier fällt das zugesetzte Magnesium unter gleichen Bedingungen wie das Mg der Asche, so daß man eine quantitative Abschätzung gewinnt.

Mathematisch behandelt *Lorber* (18) dieses Prinzip, und seine Formeln können auch wir bei der Berechnung der Magnesiummenge anwenden.

Führen wir die Reaktionen, wie eben erwähnt, mit der halben Menge der Asche aus, so ist

$$\tfrac{1}{2}\, x \text{ mg Mg} = a\text{-Grad unserer Skala;}$$

im zweiten Falle fügen wir ½ mg Mg zu und erhalten

$$\tfrac{1}{2}\, x \text{ mg Mg} + \tfrac{1}{2} \text{ mg Mg} = b\text{-Grad unserer Skala.}$$

Beide Gleichungen kann man nach *Lorber* in eine Proportion bringen, welche lautet:

$$\tfrac{1}{2}\, x : \tfrac{1}{2} \text{ mg Mg} = a : (b - a),$$

somit

$$x = \frac{a}{b-a} \cdot 0{,}01 \text{ mg Mg.}$$

Wenn man den Gehalt an Milligrammen Mg ausrechnen will, so multipliziert man die Größe mit dem Quotienten:

$$\frac{100}{\text{(Die Menge des abgewogenen Materials in Grammen)}}.$$

Die folgenden Beispiele zeigen, bis zu welchem Grade die Ergebnisse unserer kolorimetrischen Methode durch Anwendung dieser beiden Prinzipien genauer werden.

Tiegel Nr. I	II	III	IV
15,13 g	15,41 g	16,40 g	16,40 g
17,26 g	17,50 g	17,50 g	17,54 g
2,13 g	2,09 g	1,10 g	1,14 g Blutserum

Die Reaktionen wurden wie oben angegeben durchgeführt, und es ergab sich:

a	— 1,3	1,0	2,0	— 2,5
b	— 2,7	2,2	3,5	4,0
b — *a*	1,4	1,2	1,5	1,5

Rechnet man nach der oben angeführten Formel auf Milligrammprozente Mg um, wozu man gut die logarithmische Regel verwenden kann, so erhält man pro 100 g Serum:

für I . . . . 1,37 mg-% Mg
„ II . . . . 1,26 „ Mg
„ III . . . . 1,21 „ Mg
„ IV . . . . 1,46 „ Mg

Vergleicht man diese Ergebnisse untereinander, so sieht man, daß sie sich einander nähern und daß der Mittelwert 1,32% den Literaturangaben über die Magnesiummenge im Pferdeblut entspricht, obgleich



man berücksichtigen muß, daß die Werte im allgemeinen auf 100 ccm angegeben werden, was dem Gewicht nach mehr ist als die hier durchgerechneten 100 g.

Die Differenz $(b - a)$ gibt an, wie die zu verschiedenen Aschen zugegebenen 0,005 mg Mg fällen. Dieser Wert sollte überall gleich sein, wir sehen jedoch, daß er in Zehnteln variiert, was man entweder durch die Anwesenheit verschiedener Mengen löslicher Salze in einzelnen Proben oder auch durch das ein wenig geänderte p_H erklären kann. Möglicherweise kann hierbei auch die Masse der Tiegel eine Rolle spielen.

Zur Kontrolle führte ich noch eine Reihe von Analysen durch, deren Ergebnisse anzuführen sich erübrigt. Es wurde folgendes ermittelt: Wenn die Veraschung mit Schwefelsäure nach der ursprünglichen Vorschrift ausgeführt wird, gibt die Asche von Serum, Blut usw. bis zu 0,5 g, im Vergleich mit der Kontrolle eine deutliche Aufhellung mit Tropäolin. Die zugefügten 0,005 mg Mg geben auf unserer Skala eine Differenz von etwa 1,5°. Sind mehr lösliche Salze zugegen, so ändert sich die Empfindlichkeit gegenüber Magnesium im negativen Sinne. Sollte es gelingen, die Menge der löslichen Salze zu vermindern, so wird die Reaktion viel deutlicher; 0,005 mg Mg entsprechen 5 bis 6 Graden der Skala, wenn keine Salze anwesend sind. Um die Arbeit nicht zu komplizieren, habe ich nicht ermittelt, inwieweit sich eine Vervollkommnung der Reaktion erreichen läßt, wenn man die Salze aus der Lösung etnfernt. Zur praktischen Anwendung genügen meines Erachtens die bisher erreichten Erfolge.

Die Anwesenheit organischer Lösungsmittel.

Ich gebe noch eine Reihe von Versuchen wieder, mit denen ich eine Verstärkung der Tropäolinreaktion erreichen wollte. Vor allem prüfte ich, ob durch die Anwesenheit organischer Lösungsmittel die Reaktion nicht verbessert wird, aber es zeigte sich, daß Methyl-, Äthyl- und Amylalkohol die Fällung des Magnesiums durch Tropäolin überhaupt verhindern, ebenfalls Aceton und Pyridin. Dann versuchte ich, ob die Reaktion in Anwesenheit von Ammoniak oder Kali- bzw. Natronlauge nicht deutlicher wäre. Sobald jedoch das p_H 7,0 überschritten wurde, trat eher eine Auflösung als die Fällung des Magnesiums durch Tropäolin ein. Auch die Anwesenheit von Oxalaten, Tartraten und Acetaten steht dem Verlauf der Reaktion im Wege.

Die Erhöhung der Mg-Konzentration.

Zuletzt suchte ich, um die Reaktion unter Innehaltung einfacher Manipulationen zu verbessern, die Empfindlichkeit durch Heraufsetzung der Magnesiumkonzentration zu erhöhen.

Eine Lösung, die Magnesium bei Gegenwart anderer Salze enthielt, wurde mit 0,2 ccm Tropäolin auf der Heizplatte bei etwa 90° abgedampft. Gleichzeitig unternahm ich Versuche mit Blutserum, das ich wie gewöhnlich veraschte, indem ich die Asche mit ½ ccm Wasser vermischte, 0,2 ccm Tropäolin zufügte und die Mischung zur Trockne verdampfte. In anderen Proben wog ich zweimal Serum ab und verrieb die Asche mit 1 ccm Wasser; nach etwa ¼ stündigem Auslaugen und Vermischen saugte ich ½ ccm des Inhalts in einen anderen Tiegel, wohinein ich noch 0,005 mg Mg gab.

Dann führte ich die Tropäolinreaktion aus, ließ die Mischung austrocknen, gab 1 ccm Wasser zu, vermischte und verdünnte nach 10 Minuten auf 5 ccm, nach weiteren 10 Minuten goß ich in die Zentrifugierröhrchen und zentrifugierte scharf ab.

Dann gab ich alles in die Eprouvetten und verglich mit der Skala. Leider gelang auch hier nicht die beabsichtigte Vervollkommnung der Methode, es bleibt somit nur der oben angegebene Weg, d. h. die löslichen Salze aus der Reaktion zu entfernen.

Kritik, Formulierung des Arbeitsganges, nötige Einrichtung.

Die Tropäolinmethode der Magnesiumbestimmung bietet gegenüber den bisher bekannten Methoden in einer kurzen Zeit mit einfachen Mitteln befriedigende Erfolge.

Zur Ausführung braucht man:

1. 0,1%ige Lösung von Tropäolin 00; die Lösung muß ganz klar sein.
2. Konzentrierte Schwefelsäure.
3. Eine Lösung von Magnesiumsulfat; 0,1013 g kristallisiertes Magnesiumsulfat in 1 Liter destillierten Wassers. 1 ccm Lösung entspricht 0,01 mg Magnesium.
4. Mindestens zwei Pipetten zu 1 ccm, geteilt in Hundertstel.
5. Mehrere Eprouvetten gleichen Kalibers aus vollkommen reinem Glase.
6. Mehrere Porzellantiegel, etwa 20 ccm.
7. Apothekerwage, fein.
8. Tiegelofen, elektrische Heizplatte, Bunsenbrenner.
9. Glasstäbchen mit einem Stückchen dickwandiger Kautschukröhre am Ende.
10. Eine gelbe Glasscheibe oder gelbes Gelatinepapier.
11. Eprouvettenstative.
12. Eine Handzentrifuge.

Zunächst stellt man sich die Skala auf folgende Weise her: In eine Reihe Eprouvetten pipettiert man 0,2 ccm Tropäolinlösung ab und füllt mit destilliertem Wasser derart nach, daß Nr. 1 5 ccm, Nr. 2 7 ccm, Nr. 3 9 ccm enthält. Nach der Vermischung gießt man aus den Eprouvetten so viel Flüssigkeit aus, daß sich in allen 5 ccm befinden. Dann verstöpselt man die Gläser, paraffiniert sie eventuell und versieht jedes einzelne mit einer Nummer.

In den Tiegel wägt man etwa 1 g Material zur Probe, gibt 2 bis 3 Tropfen Schwefelsäure hinzu und erwärmt auf der Heizplatte auf 120°, wobei die Mischung abdampft und langsam schwarz wird. (Serum, Plasma und Blut gerinnen zunächst nach Zusatz der Schwefelsäure, werden aber beim Erwärmen wieder flüssig. Man muß infolgedessen langsam erwärmen, damit die Flüssigkeit nicht aus dem Tiegel herausspritzt.) Die Temperatur wird nun erhöht und man glüht die Mischung entweder in einem Tiegelofen oder über dem Bunsenbrenner bis zur Rotglut. Nach dem Auskühlen der Asche gibt man 0,5 ccm Wasser und 0,2 ccm Tropäolinlösung hinzu, verreibt tüchtig mit Hilfe des Glasstäbchens mit Kautschuk und läßt

stehen. Nach ½ Stunde verdünnt man auf 5 ccm, vermischt und läßt 10 Minuten zentrifugieren. Darauf gießt man die Flüssigkeit in die Eprouvette ab und vergleicht mit der Skala; wenn man die Probe gegen eine weiße Fläche mit der Skala durch ein gelbes Glas oder gelbes Gelatinepapier vergleicht, so kann man noch ein Viertel Farbton zwischen den Graden ablesen.

Die Skala kalibriert man folgendermaßen: Zur Asche aus gleicher Menge Material gibt man 0,5 (oder 1,0) ccm Magnesiumsulfatlösung, die in 1 ccm 0,01 mg Mg enthält, dann 0,2 ccm Tropäolin 00, läßt ½ Stunde stehen, verdünnt auf 5 ccm, vermischt, gießt in die Zentrifugenröhrchen, zentrifugiert 10 Minuten scharf, gießt sodann aus und vergleicht die Farbtöne. Die Eprouvette, die mehr Magnesium enthält (+ 0,005 oder + 0,01), hat einen tieferen Farbton, der etwa 1 bis 2° der Skala pro 0,01 mg Mg entspricht.

Zusammenfassung.

1. Tropäolin 00 fällt das Magnesiumion aus seinen Lösungen.

2. Die Bedingungen der Reaktion sind:

a) Die Konzentration des Magnesiums. Noch 0,01 mg Mg in 1 ccm Wasser ergeben eine sehr deutliche Reaktion.

b) Die Zeitdauer der Reaktion. In 30 Minuten erreicht sie das Maximum.

c) Die Menge des Tropäolins und Magnesiums in der Lösung. Die beste Zusammensetzung ist 2 ccm 0,1 %iger Tropäolinlösung auf 1 mg Magnesium.

d) Die Reaktion des Mittelgrundes. Innerhalb p_H 6,8 bis 7,00 bei Abwesenheit anderer Salze läßt sich bis 0,001 mg Mg nachweisen.

e) Anwesenheit von Elektrolyten. Je mehr Alkalien anwesend sind, desto weniger deutlich wird die Reaktion. Am wenigsten hemmen Sulfate und vor allem Kaliumsulfat, am meisten Phosphate und darunter Natriumphosphat.

3. Andere Salze und Erdalkalien reagieren mit Tropäolin nicht; nur in stark konzentrierten Lösungen und nach der Verdünnung löst sich der Niederschlag wieder auf.

4. Der größte Teil der Schwermetallsalze, außer den farbigen, stört die Tropäolinreaktion nicht.

5. Die Anwesenheit organischer Lösungsmittel verhindert die Reaktion.

6. Der Arbeitsgang der Methode wird beschrieben, mit der man sehr rasch mit genügender Genauigkeit in kleinen Mengen von Serum, Plasma, Blut und Gewebe die Magnesiummenge mit Hilfe der Tropäolinreaktion abschätzen kann.



Literatur.

1) *Delbet* und *Fiessinger*, Biol. de la Playe de Guerre. Paris 1918. — 2) *Zondek*, Elektrolyte. Berlin 1926. — 3) *Bečka*, Čas. lék. čes. 1927; Zvěrolék. Obzor 1927; Lékárnické listy 1927. — 4) *Kramer* und *Tisdall*, Journ. of biol. Chem. **48**, 223, 1921. — 5) *Denis*, ebendaselbst **52**, 411, 1922; **41**, 363, 1920. — 6) *Kramer* und *Howland*, ebendaselbst **68**, 711, 1926. — 7) *Briggs*, ebendaselbst **52**, 349, 1922. — 8) *Condorelli*, Arch. di farmacol. sperim. e scienze aff. **40**, 71, 1925. — 10) *Hirth*, C. r. de la soc. de biol. **88**, 460, 1923. — 10) *Gadient*, Helvetia chim. acta **6**, 729, 1923. — 11) *Dienes*, Journ. of biol. Chem. **61**, 77, 1924. — 12) *Stewart* and *Archibald*, Biochem. Journ. **19**, 484, 1925. — 13) *Mirkin* und *Druskin*, Journ. of laborat. a. clin. med. **8**, 334, 1923. — 14) *Rona* und *Kleinmann*, diese Zeitschr. **137**, 157, 1923. — 15) *Leonia Kriss*, ebendaselbst **162**, 359, 1925. — 16) *Feigl* und *Havelka*, Mikrochemie, Jahrg. 2, S. 85, 1924. — 17) *L. Rosenthaler*, ebendaselbst, Jahrg. 2, S. 29, 1924. — 18) *Lorber*, diese Zeitschr. **162**, 355, 1925.

Gleichzeitige Protease- und Reststickstoffbestimmung im Blute.

Von

F. Himmerich.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium des staatlichen Forschungsinstituts für Mutter- und Säuglingsschutz in Moskau.)

(Eingegangen am 5. Oktober 1927.)

Das immer mehr zunehmende Interesse am Studium der Blutfermente hatte zur natürlichen Folge, daß entsprechende Bestimmungsmethoden auftauchten. Unter den Mikromethoden der Proteasebestimmung erfreute sich in den letzten Jahren in Rußland großer Verbreitung die Methode von *Bach* und *Subkowa* (1).

Die proteolytische Kraft des Blutes soll nach dieser Methode an der Verringerung der Katalaseaktivität, welche die Blutlösung nach einstündigem Stehen im Brutschrank erleidet, gemessen werden. Will man auch die mit negativem Resultat verlaufenen Verdauungsversuche mit Trypsin, wie sie *Steppuhn* und *Timofejewa* (2) an Blutlösungen anstellten. nicht für voll beweisend betrachten, so bleibt doch ein unangenehmer Umstand bestehen, daß wir es hier nämlich mit einer indirekten Bestimmungsmethode zu tun haben.

Von diesen Überlegungen ausgehend, hat mir Herr Prof. *Wl. Ir. Skworzow* im Jahre 1925 nahegelegt, zu versuchen, die Proteasewirkung des Blutes, ähnlich wie *Jobling* (3), mittels Autolyse zu bestimmen, und zwar derart, daß in 0,1 ccm Blut gleichzeitig auch der Reststickstoff mitbestimmt würde.

Jobling schlug bekanntlich vor, die proteolytische Kraft des Blutserums an dem Reststickstoffzuwachs zu messen, welcher im Verlauf vielstündiger Autolyse, die durch Schütteln mit Chloroform in Gang gesetzt wird, entsteht. Nach *Jobling, Delezenne, Yamakava, Okubo* und anderen Autoren (4) soll durch das Schütteln des Serums mit Chloroform aus ersterem eine die Wirkung der Proteasen hemmende Substanz entfernt werden; diese hypothetische Substanz wurde mit dem Namen „Antitrypsin“ belegt. Auf Grund seiner Versuche mit *Petersen* identifizierte *Jobling* das Antitrypsin mit ungesättigten Fettsäuren. Er fügte einer Trypsinlösung Natriumoleat zu, stellte dieses Gemenge auf $\frac{1}{2}$ Stunde in den Brutschrank und gab dann eine Caseinlösung hinzu. Nach einigen

Stunden Stehens im Brutschrank wurde das Eiweiß gefällt und der Reststickstoff im Filtrat bestimmt. Als Kontrolle wurde eine Trypsin-Caseinlösung ohne Seife verwendet. Es zeigte sich nun, daß in den Proben *mit* Seife immer weniger Reststickstoff gefunden wurde als in den Proben, die kein Natriumoleat enthielten. Von dieser Tatsache ausgehend, wurde nun von *Jobling* der Schluß gezogen, daß Natriumoleat die Wirkung des Trypsins hemme. Seifen gesättigter und jodierter ungesättigter Fettsäuren sollten diese hemmende Wirkung nicht mehr haben; diese Befunde wurden nun von *Jobling* und Mitarbeitern in einer Reihe weiterer Arbeiten zum Aufbau einer großzügig angelegten Hypothese von der Bedeutung der ungesättigten Fettsäuren in Physiologie und Pathologie weiterverarbeitet. Wie jedoch *Serejski* (5) zeigen konnte, haben wir es in den Versuchen mit Natriumoleat nicht mit einer Trypsinhemmung, sondern mit einer durch die Seife verstärkten Eiweißfällung zu tun; deswegen finden wir dann auch in den Proben *mit* Seife weniger Reststickstoff als in den Proben *ohne* Seife. Durch den Seifenzusatz wird außer dem Eiweiß auch noch das Trypsin teilweise gefällt.

Die antitryptische Wirkung wurde auch den Lipoidstoffen des Blutes zugeschrieben[1], was jedoch von neueren Forschern bestritten wird. *Teale* und *Bach* (6) fanden z. B., daß die Entfernung aller Lipoidstoffe aus dem Blutserum auf dessen antitryptische Wirkung ohne Einfluß bleibt; Bedingung ist dabei nur, daß die Löslichkeit der Serumeiweißkörper nicht verändert wird.

Hedin (4) denkt in bezug auf das Antitrypsin an eine spezifische Bindung des Ferments an das Serumeiweiß (Albumin), hauptsächlich in Form der Adsorption; ähnliche Ansichten werden von *Pfeiffer* (4), *Teale* und *Bach* (6) vertreten. Auch *Schierge* (7) zählt die antitryptische Wirkung des Blutserums zu den Kolloidreaktionen. Es gelang ihm, die Serumproteasen dadurch zu aktivieren, daß er mit Hilfe von Alkohol die Hydratation und Dispersität der Serumeiweißkörper verringerte. Die ganze Proteaseaktivierung würde demnach also in einer Änderung des kolloidalen Gleichgewichts des Serums bestehen, ohne Entfernung eines besonderen Antiferments aus demselben. Diese kolloidchemische Auffassung scheint uns der Wahrheit am nächsten zu kommen.

In bezug auf andere Ansichten und Details muß ich raumrücksichtshalber auf *Oppenheimers* Fermente (4) verweisen (§ 530, 542 bis 543, 555 bis 556, 577, 584 bis 586, 611, 617, 625 bis 634.)

Vorliegende Arbeit handelt von der Bestimmung der proteolytischen Kraft und des Reststickstoffes des Blutes. Dazu gesellen sich noch verschiedene Nebenbefunde, welche sich im Verlaufe der Prüfung unserer Methodik ansammelten. Auf die Frage nach der Bedeutung der Serumautolyse als Proteasebestimmungsmethode hoffe ich noch in einer späteren Abhandlung zurückzukommen; dort gedenke ich dann auch etwas näher auf die Einwände einzugehen, welche *L.* und *X. Utkin-Ljubowzow* (8) gegen die Autolyse als Untersuchungsmethodik erheben. Hier möchte ich nur auf zwei Momente hinweisen, die die Veröffentlichung der von mir ausgearbeiteten Proteasebestimmung im Vollblut

[1] Näheres bei *C. Oppenheimer*, l. c.



rechtfertigen können: 1. durch unsere Methodik wird eine gleichzeitige Bestimmung des Reststickstoffes und der proteolytischen Kraft des Vollblutes ermöglicht; 2. zur Bestimmung sind nur sehr kleine Blutmengen (0,1 ccm) erforderlich, was öftere Wiederholung der Untersuchung, auch im Verlaufe eines Tages, ermöglicht.

Die Methodik selbst gestaltet sich folgendermaßen: Aus dem Einstich auf der Fingerkuppe wird mit einer Mikropipette 0,1 ccm Blut entnommen und in 1,4 ccm doppeltdestillierten Wassers, welches sich in einem unten spitz zulaufenden Zentrifugenglas befindet, hineingeblasen; die Pipette wird durch zwei- oder dreimaliges Aufsaugen der gewonnenen Blutlösung nachgewaschen. Aus den so erhaltenen 1,5 ccm hämolysierten Blutes werden nun mit einer exakt kalibrierten Pipette (Teilung $^1/_{100}$ ccm) von 1 ccm Inhalt 0,75 ccm entnommen und in ein anderes Zentrifugenglas übergeführt. In beide Reagenzgläser kommen nun je 0,1 ccm destillierten Chloroforms, wonach sie im Verlaufe von 30 Sekunden ziemlich energisch geschüttelt werden; das Blut kommt dabei in kreisende Bewegungen. In das eine Reagenzglas kommen nun 0,75 ccm einer 6%igen Lösung von Trichloressigsäure, worauf das Glas mit einem gewöhnlichen Kork versehen, kurz geschüttelt und auf etwa 10 Minuten hingestellt wird. Das andere Glas (die andere Hälfte des Blutes) wird mit einem Korkstopfen gut verschlossen und auf 24 Stunden in den Brutschrank (38°) gestellt. Die erste Probe wird nach etwa 10 Minuten langem Stehen bei 2000 bis 3000 Touren 1,5 bis 2 Minuten lang zentrifugiert und in ein kleines, aus gutem Papier hergestelltes Filter (Länge der Kante etwa 1,2 bis 1,5 cm) abgegossen. Aus dem erhaltenen Filtrat werden nun genau 0,5 ccm in ein Jenaer Glas (Länge etwa 18 cm) übergeführt und nach der von mir (9) modifizierten Methodik von *Acel* (10) verascht. Diese Bestimmung gibt uns den Reststickstoff des Blutes an; wir rechnen ihn, wie allgemein angenommen, in Milligramm Stickstoff auf 100 ccm Blut um.

Nach 24stündigem Verweilen im Brutschrank wird die zweite Probe im Wasser abgekühlt und genau wie die erste Probe behandelt. Die Veraschung der Brutschrankprobe zeigt nun im Vergleich zur ersten Probe einen mehr oder weniger großen Reststickstoffzuwachs an. Dieser Zuwachs gibt uns ein Maß zur Messung der proteolytischen Kraft des Blutes und kann Proteasezahl genannt werden. Beispiel: Der Reststickstoff wurde in der ersten Probe bestimmt = 50 mg Stickstoff in 100 ccm Blut; in der Brutschrankprobe — 130 mg N in 100 ccm Blut; hieraus Proteasezahl: 130 — 50 = 80 mg N in 100 ccm Blut.

Zur Bestimmung der relativen Genauigkeit der Methodik wurden wiederholt von genügenden Mengen (4,5 ccm) hämolysierten Blutes Parallelbestimmungen ausgeführt. Hier einige Beispiele:

Versuch Nr.	Proteasezahl in mg N auf 100 ccm Blut		Abweichung von dem arithmetischen Mittel in %
	Probe a	Probe b	
1	82,8	80,4	± 1,5
2	54,0	52,8	± 1,1
3	72,0	72,0	± 0,0
4	78,0	79,2	± 0,8

Die Übereinstimmung von Parallelbestimmungen ist demnach genügend groß. Bei Entnahme von Parallelproben direkt aus dem Einstich der Fingerkuppe wird die Differenz zwischen den erhaltenen Resultaten sich naturgemäß etwas größer gestalten.

Im Gegensatz zu *Jobling* stellen wir als Vergleichskontrolle keine durch Kochen inaktivierte Blutprobe in den Brutschrank, sondern benutzen als solche die Reststickstoffbestimmung. Hier können natürlich Bedenken kommen, ob bei dem von uns beobachteten Reststickstoffzuwachs außer der durch Blutproteasen verursachten Autolyse nicht noch eine solche von Bakterien bewirkte im Spiele sei und dabei vielleicht noch in beträchtlichem Umfange. Es wurden daher in den Brutschrank Blutproben (wie überall, ist hier hämolysiertes Blut zu verstehen, und zwar im Verhältnis 1 : 15) mit und ohne Chloroform gestellt. Während nun in einem Falle die Proben mit Chloroform einen Zuwachs an Reststickstoff um 203% und im anderen Falle sogar um 276,7% zeigten, war bei den Proben ohne Chloroform entsprechend nur eine Vermehrung des Reststickstoffes um 3,4 und 4,1% zu verzeichnen.

Genannte Proben wurden ohne Einhaltung irgendwelcher besonderen aseptischen Kautelen angestellt, trotzdem fanden wir einen Stickstoffzuwachs, der noch in den Fehlergrenzen einer Mikromethodik liegt und daher nicht unbedingt als Folge von Bakterientätigkeit zu deuten ist. In den Proben mit Chloroform haben wir zudem in bezug auf Aseptik viel günstigere Bedingungen.

Trotzdem war es für uns von Interesse, eben erwähnte Versuche unter aseptischen Versuchsbedingungen zu wiederholen. Als desinfizierendes Mittel wählten wir Fluornatrium (*Kahlbaum*). Um dabei gleichzeitig einen Einblick in die Wirkung des Fluornatriums auf die Autolyse einerseits und die Höhe des gefundenen Reststickstoffwertes andererseits zu gewinnen, wurden aus demselben Standardblute parallel auch Proben *ohne* Fluornatrium aufgestellt. Die Versuchsanordnung war folgende: 0,4 ccm Blut wurden in 3,6 ccm doppeltdestillierten Wassers geblasen. Nach halbstündiger Hämolyse wurden 2,0 ccm der Blutlösung in ein anderes Zentrifugenglas übertragen. Zur ersten Probe kam 1,0 ccm Wasser, zur zweiten 1,0 ccm einer 0,8 %igen Fluornatriumlösung. Aus der ersten Probe (ohne NaF) wurde nun in zwei Zentrifugiergläser je 0,75 ccm Blutlösung übertragen; mit derselben Pipette

wurde aus der zweiten Probe in drei andere Zentrifugengläser auch je 0,75 ccm Blutlösung übertragen. In je einer von diesen zwei Probearten wurde der Reststickstoff bestimmt, in je eine von ihnen kamen 0,1 ccm Chloroform, wonach beide letzteren Proben zusammen mit der übrig gebliebenen fünften Probe (mit Fluornatrium, aber ohne Chloroform) auf 24 Stunden in den Brutschrank kamen.

Die Resultate von drei solchen Versuchen lassen wir hier folgen:

Versuch Nr.	Rest-N in mg N auf 100 ccm Blut					Proteasezahl		N-Zuwachs mit NaF und ohne $CHCl_3$ in %	Divergenz der Proteasezahlen mit und ohne NaF in %
	mit NaF			Ohne NaF					
	Sogleich	Nach 24 Std. Ohne Chloroform	Nach 24 Std. Mit Chloroform	Sogleich	Nach 24 Std. mit Chloroform	Mit NaF	Ohne NaF		
1	52,8	54,0	146,4	51,6	144,0	93,6	92,4	2,22	1,3
2	55,2	55,2	144,0	54,0	141,6	88,8	87,6	0,0	1,6
3	60,0	61,2	144,0	58,8	139,2	82,8	80,4	2,0	2,9

Wie aus diesen Versuchen zu ersehen ist, ändert sich der Reststickstoffgehalt der Blutproben bei sterilem Aufbewahren im Zeitraume von 24 Stunden nicht merklich; die Unterschiede bewegen sich in den Fehlergrenzen der Versuchsanordnung. Da wir in der Blutlösung mit Chloroformzusatz auch ohne Fluornatrium eine genügend sterile Lösung haben, so erübrigt sich auch eine Kontrollprobe in Form von einer gekochten Blutlösung, wie es bei *Jobling* geschieht (seine Methode bezieht sich zwar nicht auf Blut, sondern auf Blutserum, was jedoch prinzipiell an der Sache nichts ändert); die Reststickstoffbestimmung ist somit eine genügend exakte Vergleichskontrolle bei Proteasebestimmungen mittels Autolyse.

Aus den hier mitgeteilten Versuchen können wir außerdem entnehmen, daß Fluornatrium weder auf die Reststickstoffbestimmung, noch auf die Wirkung der Blutproteasen einen nachteiligen Einfluß besitzt. Letzteres ist, nebenbei bemerkt, eine Bestätigung einer schon früher bekannten Tatsache (4).

Um in allen Fällen eine möglichst gleiche aktuelle Reaktion des Milieus zu haben, wurde auch versucht, das destillierte Wasser durch Phosphatpuffer zu ersetzen. Wir hatten damit aber wenig Glück: erstens litt unter dem Pufferzusatz begreiflicherweise die Hämolyse des Blutes, und zweitens bildete sich nach der Veraschung im Reagenzglase eine solche Trübung der zu kolorimetrierenden Lösung, daß an eine Stickstoffbestimmung nicht zu denken war. Nimmt man immer doppeltdestilliertes Wasser, so sind die Schwankungen des p_H in verschiedenen Fällen derart, daß ihnen wohl kaum eine praktische Bedeutung zugemessen werden kann.

In speziell angestellten vergleichenden Versuchen wurde außerdem gefunden, daß die Übertragung von 0,75 ccm hämolysierten Blutes aus den 1,5 ccm desselben keine merkbare Differenzen zwischen den Reststickstoffbestimmungen in den beiden erhaltenen Proben ergibt; das Schütteln des Blutes mit Chloroform und die Anwesenheit des letzteren bei der Eiweißfällung haben keinen Einfluß auf die ermittelten Reststickstoffwerte.

Bei meinen Versuchen konnte ich außerdem beobachten, daß das Schütteln des hämolysierten Blutes mit Chloroform zu einem schnelleren Ausfallen des Eiweißkoagulates bei Hinzufügung der Trichloressigsäure führt. Dieser Umstand, sowie der Wunsch, die Bedingungen der Eiweißfällung in der ersten und zweiten Probe (Brutschrankprobe) möglichst gleich zu halten, bewogen uns, auch die zur Reststickstoffbestimmung und zum Vergleich bestimmte erste Probe vor der Eiweißfällung mit Chloroform zu schütteln; dadurch wird außerdem der Fehler, welcher durch etwaige Verunreinigung des Chloroforms mit Stickstoff (z. B. aus der Luft) unterlaufen könnte, eliminiert.

Es ist bekannt, daß Chloroform bei genügender Konzentration eiweißfällend wirkt. Bei unserer Versuchsanordnung ist diese Wirkung zwar nur gering, es tauchte jedoch eine andere Frage auf: hat die lange dauernde Einwirkung des Chloroforms vielleicht zur Folge, daß die Bluteiweißstoffe durch Trichloressigsäure nicht mehr vollständig gefällt werden und dadurch eine zu hohe Stickstoffvermehrung vorgetäuscht wird? Zur Prüfung dieser Frage wurde hämolysiertes und mit Chloroform geschütteltes Blut auf 24 Stunden in den Brutschrank gestellt und mit Trichloressigsäure vermischt; in einigen Proben wurde das Eiweiß mit Phosphormolybdänsäure gefällt. Nach der Enteiweißung wurde das Filtrat mit *Spiegler-Pollacis* Reagenz auf Eiweiß geprüft. Das Resultat war in allen Fällen ein negatives.

Wir benutzen, wie gesagt, zur Enteiweißung Trichloressigsäure. Es stellte sich nun in weiteren Versuchen heraus, daß bei der Bestimmung der Proteasewirkung nach dem Reststickstoffzuwachs es durchaus nicht gleichgültig ist, was für ein Eiweißfällungsmittel angewandt wird. Es dürfte wohl von vornherein klar sein, daß hier nur solche Fällungsmittel anzuwenden sind, welche bei vollkommener Enteiweißung die Zwischenstufen der Eiweißspaltung, den sogenannten Peptidstickstoff nicht mitfällen. Trichloressigsäure gehört nach Untersuchungen von *Hiller* und *van Slyke* (11) gerade zu solchen Fällungsmitteln. Außerdem stört sie nicht die nachfolgende kolorimetrische Stickstoffbestimmung.

Nun zu den Versuchen mit verschiedenen Enteiweißungsmitteln. Phosphormolybdänsäure fällt bekanntlich nicht weniger energisch als Phosphorwolframsäure; von letzterer wissen wir aber aus den schon erwähnten Versuchen von *Hiller* und *van Slyke*, daß sie mit den Eiweiß-

stoffen auch die peptidartigen Verbindungen, den sogenannten Peptidstickstoff fällt. Ich benutzte daher ein mir zur Verfügung stehendes Phosphormolybdänsäurepräparat zur Herstellung einer eiweißfällenden Lösung nach *Bang* (12). Da diese Lösung wie die Trichloressigsäurelösung zu einem gleichen Volumen hämolysierten Blutes kam, so bereitete ich sie doppelt so konzentriert wie *Bang* zu.

In zwei Parallelversuchen erhielt ich folgende Resultate:

Versuch Nr.	Rest-N-Zuwachs in mg N auf 100 ccm Blut		b) : a)
	a) mit Trichloressigsäure	b) mit Phosphormolybdänsäure	
1	78,6	40,8	0,52
2	79,0	48,0	0,61

Es entsteht natürlich die Frage, wie diese große Differenz zwischen den Bestimmungen mit verschiedenen Eiweißfällungsmitteln zu deuten sei? Die Ursache dieser Differenz ist wohl darin zu suchen, daß bei der Autolyse Peptide einerseits und Aminosäuren, Harnstoff und dergleichen (weiter kurz „Aminosäuren" genannt) andererseits entstehen: in dem Falle, wo Phosphormolybdänsäure benutzt wurde, konnten wir nur den Zuwachs an „Aminosäuren" erfassen, bei der Trichloressigsäurefällung dagegen wurde auch der Zuwachs an Peptiden erfaßt, wodurch die höheren Zahlen für den Rest-N-Zuwachs bei Verwendung von Trichloressigsäure bedingt sind.

Beispiele ähnlicher Art finden wir auch in der Literatur. So fanden *Rona* und *Mislowitzer* (13), daß bei der Leberautolyse die Eiweißspaltungsprodukte hauptsächlich aus peptidartigen Verbindungen bestehen, die Zahl der Aminosäuren, des Harnstoffs und des Ammoniaks dagegen in den Hintergrund trete. *Hertzmann* und *Bradley* (14) fanden gleichfalls, daß bei der Autolyse der Eiweißzerfall nicht vollständig bis zur Bildung von Aminosäuren gehe, zwischen den Mengen der gebildeten Peptide und Aminosäuren bildet sich ein gewisser Gleichgewichtszustand, welcher bei der Erepsinwirkung durch die Zahl 0,56 ausgedrückt wird. Dieser Gleichgewichtszustand soll nach denselben Autoren in weiten Grenzen nicht von dem p_H des Milieus abhängen. In unseren Versuchen drückt sich das Verhältnis $\frac{\text{Aminosäuren}}{\text{Aminosäuren} + \text{Peptide}}$ durch die Zahlen 0,52 und 0,61 aus (siehe Tabelle). Wie ersichtlich, schwanken diese Zahlen um die von den amerikanischen Autoren gefundene Zahl (0,56). Es lag nicht in unserer Absicht, diese Fragen eingehender zu studieren, sie werden hier nur gestreift, um zu zeigen, warum ich es für möglich halte, auch in den hier mitgeteilten Autolyseversuchen eine nicht vollständig zu Ende gehende Eiweißspaltung anzunehmen.

Was die angeführten Untersuchungen jedenfalls lehren, ist: 1. es muß in allen Fällen der Proteasebestimmung nach dem Reststickstoffzuwachs immer ein und dasselbe Eiweißfällungsmittel angewandt

werden, 2. als solche sind nicht zu verwenden jene Fällungsmittel, welche — wie Phosphorwolframsäure — die Peptide vollständig oder — wie kolloidales Eisen — teilweise niederschlagen. Außer der hier geradezu idealen Trichloressigsäure wäre vielleicht noch die von *Pincussen* (15) vorgeschlagene kombinierte Fällung mit Trichloressigsäure und Natriumwolframat zu versuchen; diese Art der Enteiweißung soll Reststickstoffwerte ergeben, die sogar noch etwas höher sind als solche, die mit Trichloressigsäure erhalten werden.

Im Anschluß daran möchte ich in bezug auf Reststickstoffbestimmungen noch hinzufügen, daß zu den Vorzügen der Trichloressigsäure noch der Umstand gehört, daß sie nach Untersuchungen von *Minich* (16) in Parallelversuchen sehr gleichmäßige und wenig schwankende Werte ergibt; die erhaltenen Werte stimmen nach Untersuchungen von *Richter-Quittner* (17) mit den durch Dialyse erhaltenen Reststickstoffwerten weitgehend überein. Wir erhalten hier also eine Trennung der nicht dialysablen, kolloidalen Stickstoffverbindungen von den dialysablen, was uns persönlich als die natürlichste Grenze zwischen den Eiweißstoffen und dem sogenannten Reststickstoff erscheint. All diese Gründe lassen es wohl als berechtigt erscheinen, die Eiweißfällung mit Trichloressigsäure bei Reststickstoff- und Proteasenbestimmungen (nach dem Rest-N-Zuwachs) als die zurzeit beste zu nennen.

Bei der klinischen Anwendung der hier beschriebenen Proteasebestimmung ist zu beachten, daß die Blutproteasen sehr verschiedener Herkunft sind. Hierher gehören einerseits die Proteasen der Formelemente, hauptsächlich der neutrophilen Leucocyten (4), dann die bei klinischen Fragestellungen wohl wichtigsten Gewebsproteasen und schließlich Proteasen, die in die Blutbahn aus dem Verdauungstraktus gelangt sind. So fand *Kotschneff* (18) bei nach *London* angiostomierten Hunden nach Fleischfütterung eine beträchtliche Proteasevermehrung im Blutserum, besonders im Pfortadersystem. Über ähnliche Befunde berichteten auf dem XII. Internationalen Physiologen-Kongreß in Stockholm *W.* und *A. Boldyreff* (19). Zwecks möglichster Ausschaltung dieser Verdauungsproteasen ist das Blut womöglich immer morgens nüchtern zu entnehmen. Um weiter wenigstens einigermaßen eine Vorstellung von dem Einfluß der Leucocytenproteasen auf die Größe der Proteasezahl zu erhalten, ist es notwendig, mit der Proteasebestimmung eine Leucocytenzählung mit Einschluß der Neutrophilenzählung zu verbinden. Eine solche Gegenüberstellung chemischer und morphologischer Blutuntersuchung dürfte dem Kliniker bei wiederholten Untersuchungen wohl eine bessere Vorstellung von der Dynamik der proteolytischen Prozesse verschaffen als die Proteasebestimmung allein.

In unseren Versuchen an Säuglingen erhielten wir in etwa 50 Fällen Proteasezahlen, die zwischen 34,6 und 118,8 mg Stickstoffzuwachs in 100 ccm Blut schwankten.

Zusammenfassung.

1. Es wird eine Mikromethodik gleichzeitiger Protease- und Reststickstoffbestimmung im Vollblute beschrieben.

2. Eine Beimengung von Fluornatrium zu hämolysiertem Blute in Mengen, die zu Zwecken der Aseptik ausreichen, stört und ändert nicht die Eiweißfällung und Wirkung der Blutproteasen.

3. Schütteln von hämolysiertem Blute mit Chloroform beschleunigt das Ausfallen der Eiweißstoffe bei der nachfolgenden Fällung mit Trichloressigsäure, ohne auf die Höhe der erhaltenen Reststickstoffwerte irgendwelchen Einfluß auszuüben. Die Eiweißstoffe werden auch nach stundenlanger Berührung mit Chloroform quantitativ gefällt.

4. Bei Proteasebestimmungen nach dem Reststickstoffzuwachs ist es nicht einerlei, welches Eiweißfällungsmittel wir wählen; es darf den sogenannten Peptidstickstoff nicht fällen.

5. Bei der Blutautolyse scheint sich nach 24 Stunden der Proteasewirkung ein Gleichgewichtszustand zwischen dem Peptid- und Nichtpeptid-Reststickstoff zu bilden; die Spaltung der Proteine geht somit nicht bis zu den letzten Eiweißbausteinen.

6. Proteasebestimmungen im Vollblute sind möglichst nur nüchtern vorzunehmen; gleichzeitig sind auch die Leucocyten (einschließlich der Neutrophilen) zu zählen und zu berücksichtigen.

Zum Schluß erlaube ich mir, auch hier Herrn Prof. *Wl. I. Skworzow* für das gegebene Thema und für die mir bei der Bearbeitung des experimentellen Materials erteilten wertvollen Ratschläge meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen.

Literatur.

1) *A. Bach* und *S. Subkowa*, diese Zeitschr. **125**, 283, 1921. — 2) *O. Steppuhn* und *A. Timofejewa*, ebendaselbst **146**, 108, 1924. — 3) *I. W. Jobling, W. F. Petersen* und *A. A. Eggstein*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **24**, 460, 1916. — 4) Zitiert nach *C. Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkungen, 5. Aufl., 1925/26. — 5) *M. Serejski*, diese Zeitschr. **169**, 249, 1926. — 6) *F. Teale* and *E. Bach*, Ber. über d. ges. Physiol. u. exper. Pharm. **8**, 321, 1921. — 7) *M. Schierge* (und *C. Köster*), Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **32**, 142, 1923; **34**, 442, 1923. — 8) *L.* und *X. Utkin-Ljubowzow*, diese Zeitschr. **169**, 100, 1926. — 9) *F. Himmerich*, ebendaselbst **160**, 105, 1925. — 10) *B. Accl*, ebendaselbst **121**, 120, 1921. — 11) *A. Hiller* and *B. van Slyke*, Ber. über d. ges. Physiol. u. exper. Pharm. **16**, 16, 1923. — 12) *I. Bang*, Mikromethoden der Bluntuntersuchung, S. 32, 1923 (russisch). — 13) *P. Rona* und *E. Mislowitzer*, diese Zeitschr. **140**, 517, 1923. — 14) *A. B. Hertzmann* and *H. C. Bradley*, Ber. über d. ges. Physiol. u. exper. Pharm. **30**, 800, 1925. — 15) Zitiert nach *F. Fonseca*, diese Zeitschr. **144**, 175, 1924. — 16) *J. Minich*, ebendaselbst **142**, 266, 1923. — 17) *M. Richter-Quittner*, ebendaselbst **95**, 179, 1919. — 18) *N. Kotschneff*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **201**, **362**, 1923. — 19) *W. N. Boldyreff* and *A. W. Boldyreff*, Ber. über d. ges. Physiol. u. exper. Pharm. **38**, 843, 1927.

Beobachtungen über die Zuckerspaltung durch das Bacterium propionicum.

Von

Kurt Maurer.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 5. Oktober 1927.)

A. Fitz[1] sowie *E. v. Freudenreich* und *Orla Jensen*[2] haben vor Jahren gezeigt, daß das Bact. propionicum aus Zucker Propionsäure und Essigsäure bildet. Ferner haben sie gefunden, daß an Stelle von Zucker genau so gut Milchsäure als Substrat verwendet werden kann und daß bei der Kultur des Erregers auf Lactat dieselben Gärprodukte in praktisch gleicher Ausbeute entstehen wie aus Zucker. Diese Angaben hat *A. I. Virtanen*[3] bestätigt und hinzugefügt, daß ebenso wie Milchsäure auch Brenztraubensäure als Substrat dienen kann, da diese Substanz leicht und mit gleicher Geschwindigkeit wie Milchsäure von den Propionsäurebazillen vergoren wird. Das Verhältnis, in dem Essigsäure und Propionsäure aus Lactat (oder Zucker) hervorgehen, ist gleich 2 : 1 im Sinne der Idealgleichung

$$3\,CH_3.CHOH.COOH = 2\,CH_3.CH_2.COOH + CH_3.COOH + CO_2 + H_2O, \quad \text{(I)}$$

im Falle der Brenztraubensäure aber gleich 1 : 2, entsprechend der Formulierung (II):

$$3\,CH_3.CO.COOH + H_2O = CH_3.CH_2.COOH + 2\,CH_3.COOH + 2\,CO_2. \quad \text{(II)}$$

Diese Abweichung im Quotienten ist unabhängig von der Frage, ob Brenztraubensäure als Zwischenprodukt bei der Essig-Propionsäuregärung auftritt; keinesfalls ist sie ein Argument gegen eine solche Anschauung. *C. Neuberg*[4] hat schon dargelegt, daß sich der Quotient

---

[1] *A. Fitz*, Ber. 11, 1898, 1878.

[2] *E. v. Freudenreich* und *O. Jensen*, Chem. Centralbl. **1907**, I, 421.

[3] *A. I. Virtanen*, Soc. scient. Ferm. **1**, 36, 1923; **2**, 20, 1925.

[4] *C. Neuberg* in *C. Oppenheimer*, Handb. d. Biochem. d. Menschen u. d. Tiere, 2. Aufl., **9**, 481, 1924.

selbstverständlich umkehren muß, wenn man mit Brenztraubensäure arbeitet. Denn durch einen Zerfall der Milchsäure oder eines Zuckerhalbmoleküls gemäß der Skizzierung: $C_3H_6O_3 + H_2O = CH_3.COOH + CO_2 + 4H$, werden 4 Atome Wasserstoff frei, die gerade 2 Mol Milchsäure zu 2 Mol Propionsäure reduzieren können, so daß 3 Mol Milchsäure 1 Mol Essigsäure plus 2 Mol Propionsäure liefern. Bei einer gleichen Umsetzung der Brenztraubensäure, die ja um 2 H-Atome ärmer als Milchsäure ist, können aber nur 2 Atome H frei werden: $CH_3.CO.COOH + H_2O = CH_3.COOH + CO_2 + 2H$. Der Prozeß muß also zweimal eintreten, damit 4 H-Atome disponibel werden, die für den Übergang von Brenztraubensäure in Propionsäure erforderlich sind: ($CH_3.CO.COOH + 4H = H_2O + CH_3.CH_2.COOH$). Somit kann die Umsetzung mit Brenztraubensäure nur im Sinne obiger Gleichung (II) geschehen und muß 2 Mol Essigsäure neben 1 Mol Propionsäure liefern.

Die Tatsache, daß das Bacterium propionicum die höher oxydierte Brenztraubensäure überhaupt zur Propionsäure reduziert, erscheint so bemerkenswert, daß sie geradezu ein Argument zugunsten einer Gültigkeit der Pyruvinat-theorie auch für die Propionsäuregärung bildet. Man kann sich vorstellen, daß die Erhebung auf die Brenztraubensäurestufe ($CH_3.CHOH.COOH = CH_3.CO.COOH + H_2$) gerade den aktiven Wasserstoff für die seltsame Reduktion schafft.

Bei der Propionsäuregärung sollen nun weiterhin nach *Virtanen* 2 Arten der Zuckerspaltung nebeneinander herlaufen. Außer der erwähnten, die zu den beiden einfachen Fettsäuren führt, soll zu 19 bis 30% ein glatter Zerfall des Zuckers in Bernsteinsäure, Acetaldehyd und Wasser nach folgender Gleichung erfolgen: $C_6H_{12}O_6 = C_4H_6O_4 + CH_3.CHO + H_2O$. Dabei soll, sofern man mit lebenden Zellen arbeitet, sich der Acetaldehyd als ein *stabiles Endprodukt* ansammeln, und zwar müßte er theoretisch in einer zur Bernsteinsäureausbeute äquivalenten Menge auftreten. Diese Angabe *Virtanens* erschien mir auffallend, weil nach den Feststellungen von *C. Neuberg* und *F. Windisch*[1] das Bact. propionicum in ausgezeichneter Weise die rapide und quantitative Dismutation freien Acetaldehyds zu Äthylalkohol und Essigsäure besorgt. Außerdem haben *C. Neuberg* und *G. Gorr*[2] auch die dismutative Leistungsfähigkeit desselben Erregers gegenüber dem Methylglyoxal-hydrat festgestellt; es wird in einigen Stunden quantitativ in Milchsäure übergeführt, die unangegriffen bleibt, wenn der Versuch dann abgebrochen wird. Da die Dismutation sich unter denselben Bedingungen vollzieht, unter denen *Virtanen* gearbeitet hat, nämlich in Gegenwart von Calciumcarbonat, so habe ich die An-

[1] *C. Neuberg* und *F. Windisch*, diese Zeitschr. **166**, 454, 1925.
[2] *C. Neuberg* und *G. Gorr*, ebendaselbst **166**, 486, 1925.

gaben des Autors nachgeprüft und auf die Entstehung von freiem Acetaldehyd sowie von Bernsteinsäure gefahndet. Beide Stoffe konnten *nicht* gefunden werden, sondern nur die schon von den erwähnten älteren Autoren erhaltenen beiden Fettsäuren Essigsäure und Propionsäure.

Somit habe ich — wenigstens bei Benutzung des weiter unten erwähnten Stammes von Propionsäure-bakterien — keine Anhaltspunkte für die Möglichkeit eines direkten Zerfalls von Zucker in Acetaldehyd und Bernsteinsäure erhalten. Nach allem, was wir bisher wissen, dürften nennenswerte Mengen Acetaldehyd unter natürlichen biologischen Bedingungen auch nicht stabil bleiben. Die Bildungsweise der Bernsteinsäure, deren Auftreten bei anderen Bakteriengärungen, z. B. bei der Coli-gärung durch *Hardens* klassische Arbeiten sichergestellt ist, kann noch nicht als geklärt gelten. In bestimmten Fällen wird mit einer sekundären[1] Entstehung der Bernsteinsäure, etwa im Sinne der *Thunberg-Wieland*schen Theorien, zu rechnen sein, soweit keine Produktion aus Eiweißstoffen des Nährbodens und der Erreger selbst gemäß *F. Ehrlichs* Befunden in Betracht kommt.

Der Mechanismus der saccharogenen Propionsäurebildung auf biologischem Wege ist undurchsichtig. Denn alle die angeführten Formeln sind nur Umschreibungen für die Tatsache, daß die aus Zucker so leicht hervorgehende Milchsäure durch eine Art Dismutation zu Essigsäure oxydiert und zu Propionsäure reduziert werden kann. Lediglich die von *Virtanen* gefundene wichtige Tatsache, daß Brenztraubensäure durch das Bact. propionicum in Essigsäure und Propionsäure nach einem klaren stöchiometrischen Verhältnis umgewandelt werden kann, gibt einen Fingerzeig für die Entstehung des benötigten labilen Wasserstoffs, und die an anderen Substraten von *Neuberg* und Mitarbeitern aufgezeigten dismutativen Kräfte des Bact. propionicum machen die Oxydo-reduktion diskutabel.

Belege.

Grundnährlösung: 40 g *Witte*-Pepton, 4 g K_2HPO_4, 10 g NaCl, 2000 g Leitungswasser. Zu 1800 ccm dieser Lösung, die in neun Kolben zu 200 ccm verteilt wurde, waren 45 g Glucose gesetzt. Nach Sterilisation im Dampftopf und Einfüllung von 5 g keimfreiem Calciumcarbonat in jeden Kolben wurde von einer frischen Kultur des Bacillus propionicus[2] eingeimpft. Die Kolben wurden unter Watteverschluß bei 37° aufbewahrt und öfter durchgeschüttelt.

Nach 10 Tagen wurden 100 ccm steril entnommen und davon am Intensivkühler 50 ccm in eine eisgekühlte Vorlage abdestilliert. Eine Probe

[1] Nach *Virtanens* eigenen Angaben (l. c.) scheint die Produktion von Bernsteinsäure am Anfang der Gärung verhältnismäßig kleiner zu sein als am Ende.

[2] Den Stamm hat Herr Prof. *R. Burri* in Bern-Liebefeld dem hiesigen Institut in entgegenkommender Weise zur Verfügung gestellt.



des Destillats zeigte nach Zusatz von Nitroprussidnatrium und Piperidin eine rötliche Färbung. Nach nochmaliger Destillation der 50 ccm auf 25 ccm gab diese Probe eine violette Färbung, zeigte also dasselbe Phänomen, wie *Virtanen* es angibt, nur beruht die Färbung nicht auf dem Vorhandensein von Acetaldehyd, sondern auf Spuren von Schwefelwasserstoff. Die Farbreaktion verschwand nämlich vollkommen, wenn das Destillat über $PbCO_3$ rektifiziert wurde. Das Bleicarbonat wurde dabei dunkel (PbS). Der Schwefelwasserstoff kann nur durch die stark reduzierenden Bakterien aus der Nährlösung, und zwar aus dem *Witte*-Pepton, erzeugt sein, welches schwefelhaltig ist.

Bestimmung der flüchtigen Säuren durch Wasserdampfdestillation.

180 ccm des Gärgutes wurden von der Kreide abfiltriert, mit n H_2SO_4 angesäuert und so lange mit Wasserdampf behandelt, bis das Destillat neutral ablief. Es wurden 1800 ccm Destillat aufgefangen und von diesen mehrere Proben mit n/10 NaOH gegen Phenolphthalein titriert, wobei ein durch die Kohlensäure verursachter Fehler unberücksichtigt blieb.

50 ccm Destillat verbrauchten 0,90 ccm n/10 NaOH,
100 „ „ „ 1,85 „ n/10 NaOH.

Daraus errechnet sich für 1800 ccm Gärgut ein Gehalt an flüchtigen Säuren entsprechend 185 ccm n/10 Lauge. Sie bestanden aus Essigsäure und Propionsäure.

Aufarbeitung des Rückstandes.

Die von den flüchtigen Säuren befreite Flüssigkeit wurde auf dem Wasserbad bis auf ein kleines Volumen eingeengt, mit Ammonsulfat gesättigt und bei schwefelsaurer Reaktion 10 Stunden mit Äther extrahiert, um etwa vorhandene Bernsteinsäure zu isolieren. Nach Verjagen des Äthers blieb ein hellbrauner Sirup (0,7 g) zurück, der abweichend von *Virtanens* Angaben, keinerlei Kristallisationsneigung zeigte. Der Sirup wurde in Wasser gelöst, neutralisiert und mit Silbernitratlösung versetzt, doch fiel kein bernsteinsaures Ag aus, vielmehr schied sich metallisches, fein verteiltes Ag ab, das kein Succinat einschloß.

Nach 25 Tagen wurde wieder ein Teil des Gärgutes aufgearbeitet:

a) 500 ccm des Gärgutes wurden vom Calciumcarbonat abfiltriert, dann wurden zunächst ohne Ansäuern 100 ccm übergetrieben. Eine Probe dieser 100 ccm zeigt mit Nitroprussidnatrium deutliche Rotblaufärbung. Nach Rektifikation über Bleicarbonat verschwand die Farbreaktion wiederum. Es genügte schon, eine Probe des Destillats mit $PbCO_3$ zu schütteln, welches sich dabei dunkel färbt, um im Filtrat keine Spur von Färbung mit Nitroprussidnatrium + Piperidin mehr zu erhalten. Acetaldehyd konnte also nicht vorhanden sein.

Nach Ansäuern mit H_2SO_4 wurde mit Wasserdampf destilliert, ein Destillat von 3000 ccm aufgefangen und in diesem durch Titration ein Gehalt an flüchtigen Säuren entsprechend 384 ccm n/10 NaOH festgestellt. Der von den flüchtigen Säuren befreite Rückstand wurde auf dem Wasserbad auf ein kleines Volumen gebracht, mit Ammoniumsulfat gesättigt und 16 Stunden mit Äther extrahiert. Dieser hinterließ wiederum einen braunen Sirup (0,8 g), der mit wenig Wasser in eine Kristallisierschale gespült und im Vakuumexsikkator langsam zur Trockne gebracht wurde.

Kristallisation trat nicht ein. Der Sirup wurde in Wasser gelöst; er verbrauchte 6 ccm n/10 NaOH zur Neutralisation (0,8 g Bernsteinsäure würden 135,5 ccm n/10 NaOH benötigen). Silbernitrat schied aus der neutralisierten Flüssigkeit sofort metallisches Silber ab; Bernsteinsäure war nicht vorhanden. Die Reduktion ist auf Spuren von Ameisensäure bzw. andere Produkte zurückzuführen, die aus der Nährflüssigkeit unter der Einwirkung von Mineralsäure hervorgehen.

b) Zur Kontrolle wurde noch eine zweite Aufarbeitung nach 27tägigem Stehen im Brutschrank durchgeführt.

600 ccm des Gärgutes wurden filtriert, davon wurden 100 ccm in einem Meßkolben zurückbehalten, 500 ccm mit Phosphorsäure angesäuert und mit Wasserdampf behandelt. 5100 ccm Destillat wurden aufgefangen, durch Titration wurde ein Gehalt an flüchtigen Säuren entsprechend 459 ccm n/10 NaOH in 500 ccm Gärgut ermittelt.

Zuckerbestimung: In 50 ccm der Lösung wurden nach Enteiweißung 127,5 mg Glucose nach *Bertrand* gefunden. Dies entspricht einem Zuckergehalt von 4,59 g in 1800 ccm Gärgut, gegenüber einem Anfangsgehalt von 45 g Glucose.

Milchsäurebestimmung: 50 ccm des Gärgutes wurden nach *Schenk* enteiweißt, dann mittels Kupfer-Kalkfällung von Kohlenhydraten befreit und zur Entfernung etwa vorhandenen Alkohols auf dem Wasserbade eingedampft. Zwei Bestimmungen ergaben die Anwesenheit von 0,66 und 0,52 g scheinbarer Milchsäure in 1800 ccm Gärgut[1].

Nach Vertreiben der flüchtigen Säure geschah die Aufarbeitung des Rückstandes in der üblichen Weise. Durch Ätherextraktion wurden 1,2 g eines braunen Sirups isoliert, in dem wiederum Bernsteinsäure unauffindbar war.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft danke ich ehrerbietigst für die zur Verfügung gestellten Mittel.

[1] Bei der bakteriellen Spaltung eines anderen Kohlenhydrates, des d-Glucosamins, erhielten *E. Abderhalden* und *A. Fodor* (H. 87, 214, 1913) Milchsäure neben hauptsächlich Propionsäure.



Glycerophosphatase des Zentralnervensystems.

Glycerophosphatase beim Menschen und bei Tieren.

Von

Vladimír Vondráček.

(Aus dem Institut für medizinische Chemie der böhmischen Universität Prag.)

(Eingegangen am 10. Oktober 1927.)

A. Glycerophosphatase bei Menschen.

Seit der Entdeckung der fermentativen Spaltung der Glycerinphosphorsäure in der Natur, welche zum ersten Male *C. Neuberg* und *L. Karczag*[1] beschrieben, verflossen 16 Jahre. Während dieser Zeit wurde in den Forschungen nach den Fermenten, welche die organischen Phosphorsäureverbindungen spalten, sehr viel geleistet.

Statt des ursprünglich einen bekannten Ferments, kennt man heute deren acht. *Oppenheimer*[2] unterscheidet schon in seinem Werke vom Jahre 1927 Glycerophosphatase, Hexosediphosphatase, Phosphatese, Hexosemonophosphatase, Saccharophosphatase, Amylophosphatase, Phytase und Aminophosphatase. Die Phosphatasen wurden sowohl in Pflanzen als auch im Tierkörper nachgewiesen. Im Tierorganismus entdeckten sie zum erstenmal *Grosser* und *Husler*[3]. Vor 4 Jahren war es *Elemér Forrai*[4], welcher eine ganze Reihe von Organen auf den Gehalt an Glycerophosphatase untersuchte und konstatierte, daß kein Organ mesenchymalen Ursprungs Glycerophosphatase enthält. Mit Bezug darauf, daß einige Organe keine Glycerophosphatase enthalten, ist es klar, daß diese kein Ferment von allgemeiner biologischer Wichtigkeit ist, sondern daß ihr vielleicht eine spezielle Bedeutung in einigen Geweben, wahrscheinlich in dem Stoffwechsel zukommt.

Sehr anregend sind in dieser Hinsicht die Arbeiten der amerikanischen Autoren *R. Robison* und seiner Mitarbeiter[5]. Es scheint auf Grund ihrer Versuche, daß durch die Wirkung der Knochenphosphatase die mit dem Blute an eine bestimmte Stelle transportierte lösliche Monohexosephosphorsäure gespalten und als unlösliches Calciumphosphat in den Knochen gespeichert wird. Allerdings fehlt es dabei nicht an verschiedenen Einwänden.

Durch einen sonderbaren Zufall wurde bei dem Studium der Phosphatase das Verhalten der verschiedenen Organe beobachtet, aber dem

[1] *C. Neuberg* und *L. Karczag*, diese Zeitschr. **36**, 60, 1911.

[2] *Carl Oppenheimer*, Lehrb. d. Enzyme 1927.

[3] *Paul Grosser* und *Josef Husler*, diese Zeitschr. **39**, 1, 1912.

[4] *Elemér Forrai*, ebendaselbst **142**, 181, 1923.

[5] *R. Robison*, Biochem. Journ. **17**, 286, 1923; *R. Robison* and *K. Marjorie Soames*, ebendaselbst **18**, 746, 1924.

Zentralnervensystem wurde gerade sehr wenig Aufmerksamkeit gewidmet, welches eben meistens die Phosphatide und selbst gebundene Glycerinphosphorsäure enthält, wobei die Phosphatide (Lecithin und Cephalin) eine wichtige biologische und vielleicht auch eine funktionelle Rolle spielen. Auffallenderweise geschah es, daß die Autoren, welche sich mit dem Studium der Fermente des Zentralnervensystems befaßten, von denen man auf Grund *Slowtzoffs*[1] Arbeiten schon 28 kennt, der Phosphatase keine Aufmerksamkeit widmeten.

Obzwar man in der Naturwissenschaft die Worte „a priori" und „per analogiam" grundsätzlich ausschalten muß, verführt uns dennoch die Biochemie der Pflanzen dazu, das Vorhandensein der Glycerophosphatase im Nervensystem vorauszusetzen. Denn bei dem Studium verschiedener Samen auf ihren Gehalt an Glycerophosphatase, welche *A. Němec*[2] und seine Mitarbeiter unternahmen, wurde festgestellt, daß die Samen mit der größten Menge von Phosphatiden die intensivste Wirkung der Glycerophosphatase zeigen, während Samen mit großem Eiweißgehalt nur kleinere. Samen mit bedeutendem Kohlehydratgehalt die kleinste Wirkung aufweisen.

Zu dem Studium der Glycerophosphatase des Nervensystems wurde die etwas modifizierte Methode *Grosser-Husler*[3] und *Němec*[2] verwendet. Es wurde mit 1%iger Natriumglycerophosphatlösung gearbeitet, welche zu jedem Experiment frisch vorbereitet wurde. Diese Lösung soll theoretisch in 100 ccm 0,3591 g P_2O_5 enthalten. *Němec* fand 0,3572 g P_2O_5, unsere Analyse ergab 0,3575 g P_2O_5. P_2O_5 wurde nach der Zerstörung der organischen Substanz nach *Neumann* als $Mg_2P_2O_7$ bestimmt.

Zu der Untersuchung benutzte man das Großhirn, Kleinhirn und Rückenmark. Von dem Großhirn wurde ein Teil vom Gyrus centralis anterior bis zu den Basalganglien, von dem Kleinhirn eine Hemisphäre genommen, während das Rückenmark in toto verarbeitet wurde. Die erwähnten Teile wurden sorgfältig in einer Reibschale zerrieben, ein Teil der zerriebenen Masse wurde dann auf 2 Minuten in siedendes Wasser gebracht, um das Ferment zu zerstören. Das eigentliche Experiment wurde auf folgende Weise ausgeführt.

Von jedem Teil des Zentralnervensystems wurden drei Proben zu je 5 g in Bechergläser abgewogen, und zwar:

Gefäß Nr. 1: 5 g des Gehirns + 100 ccm 1%ige Glycerophosphatlösung und 5 ccm Toluol,
„ „ 2: 5 g Gehirn — 100 ccm physiologischer Lösung — 5 ccm Toluol.
„ „ 3: 5 g des gekochten Gehirns — 100 ccm 1%iger Glycerophosphatlösung — 5 ccm Toluol.

Der Zusatz der physiologischen Lösung bei Gefäß Nr. 2 erwies sich als zweckmäßiger wegen leichterer Filtrierbarkeit der Mischung

---

[1] *B. J. Slowtzoff*, Russkij physiol. Journ. **3** (ref.).

[2] *A. Němec*, diese Zeitschr. **93**, 94, 1919; *A. Němec* und *F. Duchon*, ebendaselbst **119**, 73, 1921; *A. Němec*, ebendaselbst **137**, 570, 1923; **138**, 198, 1923; Chemické listy pro vědu a průmysl XIV; *A. Němec* et *Eugen Vítek*, Annales de la science agronomique française et etangèr.

[3] *Paul Grosser* und *Josef Husler*, diese Zeitschr. **39**, 1, 1912.

nach dem Versuche. Vom Rückenmark wurde wegen Materialmangels nur je 2½ g und von der Lösung nur 50 ccm genommen. Die Resultate wurden auf 100 ccm berechnet. Alle Gefäße wurden auf 70 Stunden im Thermostaten bei 36° C aufbewahrt. Nach dem Herausnehmen aus dem Thermostaten wurde eine Messerspitze voll reinen Kaolins zugegeben, dann wurde gründlich geschüttelt und durch ein französisches Filter filtriert. Das Filtrat war ganz klar, so daß es überhaupt nicht notwendig war, Essigsäure oder Ammoniak zuzugeben. 50 ccm des Filtrats wurden unter beständigem Rühren mit 15 ccm Ammoncitratlösung und 20 ccm Magnesiamixtur versetzt. Der Zusatz von Ammoncitrat ist unbedingt notwendig, weil dadurch die sonst durch Magnesiamixtur eintretende Zersetzung des Natriumglycerophosphats verhindert wird. Die Ammoncitratlösung wird auf folgende Weise bereitet:

Eine wässerige Lösung von 150 g Citronensäure wird zu 500 ccm Ammoniak (0,91) nach und nach zugesetzt, die Lösung nach dem Erkalten auf 1500 ccm aufgefüllt.

Der Niederschlag wurde nach 24stündigem Stehen abfiltriert, mit 2½% Ammoniak gewaschen, getrocknet und im elektrischen Ofen verbrannt und gewogen. $Mg_2P_2O_7$ wurde auf P_2O_5 berechnet. Bei den Kontrollen (Reihe 2 und 3) wurden größtenteils nur Spuren von Phosphorsäure nachgewiesen. Diese entsteht in der Reihe 2 infolge der autolytischen Vorgänge in den Phosphorverbindungen des Zentralnervensystems, in der Reihe 3 durch unvermeidliche Zersetzung des Glycerophosphats.

Bei der Beschaffung des Materials vom menschlichen Zentralnervensystem zeigte sich die technische Schwierigkeit, sofort nach dem Tode die zugehörigen Bestandteile des Zentralnervensystems zu gewinnen. Diese Schwierigkeit war unüberwindlich, so daß oft zwischen dem Tode des Individuums und der Verarbeitung seines Gehirns auch 12 Stunden verflossen. Um festzustellen, inwiefern dieser Umstand auf die Resultate der Experimente einwirkt, wurde folgender Versuch durchgeführt: Es wurde das Gehirn eines Kalbes 1 Stunde nach dem Schlachten des Tieres bearbeitet, der Rest des Gehirns wurde in zwei Teile geteilt, von denen der eine Teil auf 24 Stunden in den Eiskasten gelegt, der zweite auf dieselbe Zeit bei Zimmertemperatur von 20° C gelassen und nachher erst untersucht wurde. Die Resultate waren die in Tabelle I wiedergegebenen.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, zeigen die Kontrollversuche b) und c) eine gesteigerte Zerstörung des zugesetzten Natriumglycerophosphats und eine Steigerung der autolytischen Vorgänge in dem Gewebe an, was auf das lange Aufbewahren des isolierten Gehirns zurückzuführen wäre. Da aber in den Versuchen mit dem menschlichen Gehirn

Tabelle I.

5 g Gehirn + 100 ccm 1 % iges Natriumglycerophosph.			5 g Gehirn + 100 ccm 1 % iges Na Cl		5 g Gehirn (gekocht) + 100 ccm 1 % iges Natriumglycerophosph.			Nach der Abzählung	
$Mg_2P_2O_7$	P_2O_5	%	$Mg_2P_2O_7$	P_2O_5	$Mg_2P_2O_7$	P_2O_5	%	P_2O_5	%
a) Das Gehirn verarbeitet 1 Stunde nach dem Schlachten des Tieres.									
0,1277	0,0814	22,70	Spuren	Spuren	θ	θ	θ	0,0814	22,76
b) Das Gehirn verarbeitet nach 24 Std. Während dieser Zeit in dem Eiskasten.									
0,1356	0,0865	24,21	0,0255	0,0163	0,0235	0,0150	4,21	0,0551	15,42
c) Das Gehirn verarbeitet nach 24 Std. Während dieser Zeit bei 20° C Temp.									
0,1320	0,0842	23,56	0,0373	0,0238	0,0415	0,0265	7,41	0,0338	9,46

wie aus der folgenden Tabelle II hervorgeht, die diesbezüglichen Kontrollen keine solche Zersetzung aufweisen, vielmehr nur Spuren von $Mg_2P_2O_7$ nachgewiesen werden konnten, ist es höchstwahrscheinlich, daß in der Leiche in situ diese Vorgänge mit weit geringer Intensität verlaufen. Deshalb fühlen wir uns berechtigt, den Einfluß des Zeitraumes von dem Tode bis zur Verarbeitung des Materials als sehr geringfügig zu betrachten.

Die Untersuchung des menschlichen Zentralnervensystems durch die oben erwähnte Methode hatte folgende Ergebnisse:

Tabelle II.

	Teil des Zentralnervensystems	I			II	
		$Mg_2P_2O_7$	P_2O_5	%	$Mg_2P_2O_7$	P_2O_5
Nr. 1	Großhirn	0,1374	0,0876	24,5	Spuren	Spuren
	Kleinhirn	0,4113	0,2624	70,38	0,0172	0,0109
Nr. 2. 23 J., ♀, † nefritis chronic.	Großhirn	0,0748	0,0483	13,5	Spuren	Spuren
	Kleinhirn	0,0948	0,0605	16,9	„	„
Nr. 3. 27 J., ♂, † nach Herniaoperation (endocarditis chronica)	Großhirn	0,0472	0,0301	8,42	0,0180	0,0115
	Kleinhirn	0,0832	0,0530	14,85	0,0212	0,0135
Nr. 4. 51 J., ♀, † nach Operation ca. ovarii	Großhirn	0,0656	0,0418	11,7	Spuren	Spuren
	Kleinhirn	0,0976	0,0622	17,4	„	„
Nr. 5. 25 J., ♀, † nach Oedema glottidis	Großhirn	0,0772	0,0492	13,8	„	„
	Kleinhirn	0,0864	0,0551	15,4	„	„
	Rückenmark	0,0616	0,0392	11	„	„
Nr. 6. 74 J., ♂, † nach Endomesoaort. luetica	Großhirn	0,0416	0,0265	7,4	„	„
	Kleinhirn	0,0724	0,0461	13,0	„	„
	Rückenmark	0,0408	0,0260	7,3	„	„
Nr. 7. 62 J., ♂, † Fungus cubit. t. b. c. pulmonum Bronchopneum.	Großhirn	0,0712	0,0454	12,7	„	„
	Kleinhirn	0,0716	0,0456	12,7	„	„
	Rückenmark	0,0424	0,0270	7,56	„	„

Tabelle II (Fortsetzung).

	Teil des Zentralnervensystems	III			Resultierende Zahl		
		$Mg_2P_2O_7$	P_2O_5	%	$Mg_2P_2O_7$	P_2O_5	%
Nr. 1.	Großhirn	Spuren	Spuren	Spuren	0,1374	0,0876	24,5
	Kleinhirn	0,0736	0,0472	13,22	0,3202	0,2042	57,1
Nr. 2. 23 J., ♀, † nefritis chronic.	Großhirn	Spuren	Spuren	Spuren	0,0748	0,0483	13,5
	Kleinhirn	„	„	„	0,0948	0,0605	16,9
Nr. 3. 27 J., ♂, † nach Hernia-operation (endocarditis chronica)	Großhirn	„	„	„	0,0292	0,0186	5,2
	Kleinhirn	„	„	„	0,0620	0,0395	11,0
Nr. 4. 51 J., ♀, † nach Operation ca. ovarii	Großhirn	θ	θ	θ	0,0656	0,0418	11,7
	Kleinhirn	θ	θ	θ	0,0976	0,0622	17,4
Nr. 5. 25 J., ♀, † nach Oedema glottidis	Großhirn	θ	θ	θ	0,0772	0,0492	13,8
	Kleinhirn	θ	θ	θ	0,0864	0,0551	15,4
	Rückenmark	θ	θ	θ	0,0616	0,0392	11
Nr. 6. 74 J., ♂, † nach Endemesoaort. luetica	Großhirn	θ	θ	θ	0,0416	0,0265	7,4
	Kleinhirn	θ	θ	θ	0,0724	0,0461	13,0
	Rückenmark	θ	θ	θ	0,0408	0,0260	7,3
Nr. 7. 62 J., ♂, † Fungus cubit. t. b. c. pulmonum Bronchopneum.	Großhirn	θ	θ	θ	0,0712	0,0454	12,7
	Kleinhirn	θ	θ	θ	0,0716	0,0456	12,7
	Rückenmark	θ	θ	θ	0,0424	0,0270	7,56

Wie aus den Experimenten ersichtlich, ist die Wirkung der Glycerophosphatase des Kleinhirns am stärksten, geringer die des Großhirns und am geringsten die des Rückenmarkes.

Die Verhältnisse lassen sich durch folgende Übersicht veranschaulichen:

Von einer 1%igen Lösung des Natriumglycerophosphats zersetzten in 70 Stunden bei 36° C durchschnittlich:

5 g Kleinhirn . . . . 20,5 %
5 g Großhirn . . . . 12,7 %
5 g Rückenmark . . . . 8,62 %

Vielleicht ist das Kleinhirn als Organ der Regulierung des Gleichgewichtes und der Körperhaltung ein Organ, das stets parat sein muß, biologisch aktiver als das vollkommenere Großhirn und das weniger vollkommene Rückenmark, welches eher nur der zentripetalen Leitung der Reizung und der zentrifugalen Leitung der Innervation dient.

B. Glycerophosphatase bei Tieren.

Wie zuvor nachgewiesen wurde, ist die Verteilung der Glycerophosphatase im menschlichen Zentralnervensystem nicht gleichmäßig. Die größte Wirkung der Glycerophosphotase zeigt das Kleinhirn,

eine kleinere das Großhirn und die kleinste das Rückenmark. Natürlich taucht von selbst die Frage auf, ob der Gehalt an Glycerophosphatase mit der phylogenetischen Entwicklung parallel geht. Zur Sicherstellung dieser Frage wurde eine Untersuchung verschiedener Tiergehirne nach der vorher erwähnten Methode unternommen.

Es zeigten sich folgende Ergebnisse:

Gattung der Tiere	5 g des Gehirns + 100 ccm 1 %iges Natriumglycerophosph. + 5 ccm Toluol spaltet nach 70 Std. bei 36°			5 g des Gehirns + 100 ccm 0,9 %iges NaCl + 5 ccm Toluol spaltet nach 70 Std. bei 36°		
	$Mg_2P_2O_7$	P_2O_5	%	$Mg_2P_2O_7$	P_2O_5	%
Kaninchen . .	0,1390	0,0886	24,70	Spuren	Spuren	Spuren
Hund	0,2250	0,1435	40,14	Spuren	Spuren	Spuren
Hund	0,2404	0,1533	42,89	θ	θ	θ
Rind	0,1277	0,0814	22,76	Spuren	Spuren	Spuren
Schwein . . .	0,1160	0,0740	20,69	θ	θ	θ
Hammel . . .	0,1304	0,0832	23,27	θ	θ	θ

Gattung der Tiere	5 g gekochten Gehirns + 100 ccm 1 %iges Natriumglycerophosph. + 5 ccm Toluol spaltet nach 70 Std. bei 36°			Nach Abzählung der Kontrolle		
	$Mg_2P_2O_7$	P_2O_5	%	$Mg_2P_2O_7$	P_2O_5	%
Kaninchen . .	θ	θ	θ	0,139	0,0886	24,83
Hund	θ	θ	θ	0,2250	0,1435	40,14
Hund	θ	θ	θ	0,2404	0,1533	42,89
Rind	θ	θ	θ	0,1277	0,0814	22,76
Schwein . . .	0,0132	0,0084	2,34	0,0748	0,0475	13,28
Hammel . . .	0,0183	0,0117	3,27	0,0941	0,0600	16,78

Wenn wir die Wirksamkeit der Glycerophosphatase (in Prozenten der zersetzten Natriumglycerophosphatlösung ausgedrückt) mit dem Phosphorgehalt des Zentralnervensystems vergleichen, ergibt sich folgende Übersicht:

Spezies	5 g Gehirn zersetzt % 1 %ige Lösung Natriumglycerophosphorici *Merck* binnen 70 Std.	% P im Gehirn		Autor
		in frischer Substanz	in Trockensubstanz	
Kaninchen . .	24,83	0,3490—0,3925	1,584—1,936	*Kutanin* *
Hund	40,14	0,3462—0,4036	1,564—1,722	
Hund	42,89	0,3462—0,4036	1,564—1,722	
Rind	22,76	0,3422—0,3445	1,527—1,600	
Schwein . . .	13,28	0,3413—0,3867	1,506—1,651	
Hammel . . .	16,78	0,3309—0,3574	1,586—1,664	

*) *Michael Kutanin*, Beiträge zur Kenntnis der chemischen Zusammensetzung des Gehirns bei verschiedenen Tieren. 1910.



Die vergleichenden Zahlen sind nicht gleichartig; in der ersten Rubrik sind relative Zahlen, welche die Intensität der Wirkung der Phosphatase ausdrücken, in der zweiten sind absolute Zahlen, welche den prozentualen Phosphorgehalt in dem Zentralnervensystem angeben. Da sich aber die Frage von selbst aufwirft, ob in dem Zentralnervensystem, welches reicher an Phosphor ist, das Ferment, welches vielleicht eine wichtige Rolle in dem Phophorstoffwechsel spielt, auch eine intensive Wirkung hat, stellte ich beide Zahlen nebeneinander.

Wie ersichtlich, ist die Intensität der Wirkung der Phosphatase weder in einem Verhältnis zum Phosphorgehalt, noch zur phylogenetischen Reife des Zentralnervensystems.

Es bleiben noch einige Fragen zu beantworten; hat das Alter des Individuums einen Einfluß auf den Gehalt der Glycerophosphatase im Zentralnervensystem? Unterscheiden sich die graue und die weiße Substanz durch ihren Gehalt an Phosphatase voneinander? Haben die Narkotica einen Einfluß auf die Wirkung der Phosphatase?

Aus äußeren Gründen war ich gezwungen, die Experimente zu unterbrechen, und ich erlaube mir, später einen weiteren Bericht über die obenerwähnten Fragen vorzulegen.

Über den Einfluß der Cholesterinfütterung auf Erythrocytenmenge und Resistenz beim entmilzten Meerschwein.

Von

M. Dörle.

(Aus der medizinischen Universitäts-Poliklinik Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 13. Oktober 1927.)

Die Untersuchungen von *Thomas* und *Lebert* (1912), ferner von *Dörle* und *Sperling* (1924) hatten gezeigt, daß sich nach Cholesterinfütterung bzw. Injektion zur Zeit der maximalen Resorption sowohl beim Versuchstier als auch beim Menschen eine Vermehrung der roten Blutkörperchen, eine Erhöhung der Hämoglobinwerte und ein Anstieg der osmotischen Resistenz der Erythrocyten findet. Diese Untersuchungen wurden von *Halfer* (1925) nachgeprüft und bestätigt. *Dörle* und *Sperling* sprachen die Vermutung aus, daß die Ursache der Erythrocytenvermehrung mitbedingt sein könnte durch die Resistenzänderung der Erythrocyten.

Nach *Heeres* und *Bolt* (1922) ist die osmotische Resistenz der roten Blutkörper abhängig von dem Quotienten Cholesterin/Phosphaten auf ihrer Oberfläche. Nach diesen Autoren soll normalerweise die osmotische Resistenz der Erythrocyten in der Milz dadurch beeinflußt werden, daß sich das Verhältnis von Cholesterin zu Phosphat ändert. Erniedrigt sich dabei das Cholesterin, dann sinkt die Resistenz, erhöht es sich, dann steigt die Resistenz.

Auch aus den Untersuchungen anderer Autoren geht hervor, daß der Milz für das osmotische Verhalten der Erythrocyten eine große Bedeutung zukommt, und zwar soll sie den Zerfall der roten Blutkörperchen dadurch begünstigen, daß sie die Zellen schädigt und in ihrer Widerstandsfähigkeit schwächt (*St. Weiss*, 1927). Nach den Untersuchungen von *Eppinger* (1910) und von *Eppinger* und *Stöhr* (1922) ist die Resistenz der roten Blutkörperchen in der Milzvene geringer als in der Milzarterie.

Aus den Untersuchungen bei entmilzten Tieren geht hervor, daß die Milz die osmotische Einstellung der roten Blutkörperchen stark beeinflußt und reguliert. Mit Ausnahme von *Pugliese* und *Lazatti*, *Briand* und *Bauer*

berichten alle Autoren, daß nach Milzexstirpation die osmotische Resistenz der Erythrocyten ansteigt (*Pel*, 1912, *Krumbhaer, Musser* und *Paerce*, 1913, *Hil*, 1914). *Port* (1913) führt diese Steigerung auf physikalisch-chemische Veränderungen der Erythrocyten zurück. *Roccavilla* (1914) bezieht die Resistenzsteigerung auf eine Änderung des osmotischen Gleichgewichts zwischen Cholesterin, Eiweiß, Lecithin und Phosphor im Plasma.

Die Untersuchungen von *Heeres* und *Bolt* zeigen, daß die Milz als Verbrauchs- oder Ausscheidungsorgan in den Cholesterinstoffwechsel eingreift. Milzexstirpation kann Störung des normalen Cholesteringehalts des Blutes zur Folge haben. *Soper* (1914), *Sotti* und *Torri* (1916) finden nach Milzexstirpation eine mäßige Erhöhung des Blutcholesterins. Nach *Siegmund* fällt bis zum vierten Tage nach Entmilzung das Gesamtfett des Blutes. Dann nimmt das Gesamtfett stark zu, bis zum 20. oder 30. Tage, um dann langsam wieder zu sinken. Wesentlich ist hierbei die Zu- bzw. Abnahme des freien Cholesterins im Vergleich zu dem gebundenen. Die Untersuchungen von *Abelous* und *Soula* (1926) schließlich lassen einen direkten endokrinen Einfluß der Milz auf die Cholesterinbildung im Muskel annehmen.

Alle diese Untersuchungen zeigen, daß eine ungestörte Milzfunktion für den normalen Ablauf der Resistenzregulierung der roten Blutkörperchen, soweit eine solche durch die Blutlipoide erfolgt, von sehr großer Bedeutung ist.

Wie eingangs schon erwähnt, ändert sich das Verhältnis von Cholesterin zu Phosphaten, durch das die osmotische Resistenz der Erythrocyten unter sonst normalen Verhältnissen bedingt ist, nach *Heeres* und *Bolt* nur in der Milz. Es müßte sich also eine Erythrocytenvermehrung auf Grund erhöhten Cholesterinangebots und dadurch bedingter erhöhter Resistenz nur bei normaler Milz finden können. Nun berichten aber ebenfalls *Heeres* und *Bolt* (1922), daß sich nach Milzexstirpation eine Vermehrung der roten Blutkörper, eine Erhöhung der osmotischen Resistenz nur finden bei Hypercholesterinämie, und daß ein unbedingter Zusammenhang bestehe zwischen Cholesterinämie, Polyglobulie und Resistenzsteigerung. Es fragt sich nun, ob beim entmilzten Tiere die Resistenzänderung und Polyglobulie verursacht wird durch den erhöhten Cholesteringehalt des Blutes, und ob eine Resistenzsteigerung sich im strömenden Blute oder einem Ersatzorgan vollzieht, oder ob sowohl Resistenzsteigerung als auch Cholesterinämie und Polyglobulie verursacht sind durch den Wegfall des Regulationsmechanismus der Milz.

Meine Untersuchungen wurden an drei Serien entmilzter Meerschweine ausgeführt. In den drei Versuchsreihen wurde zunächst vor der Entmilzung jeweils pro Tier 0,1 g Cholesterin gefüttert und die Reaktion der Erythrocyten, der Resistenz und des Hämoglobins bei sämtlichen Tieren geprüft. Nach der Entmilzung wurde bei den einzelnen Reihen zu verschiedenen Zeiten nachuntersucht, um festzustellen, ob eine etwaige Reaktion auf Cholesterinfütterung eventuell erst einige Zeit nach der Entmilzung eintritt bzw. sich verstärkt.

Die Milz wurde nach Schrägschnitt parallel zum untersten Rippenbogen vollständig entfernt. Die Heilung der Wunde erfolgte bei allen

Tieren glatt. Eiterung trat nicht auf. Ein Tier starb im Verlauf der Versuche. Die übrigen ertrugen den Eingriff gut.

Die Erythrocytenzahl wurde wie üblich durch Auszählen in der *Thoma-Zeiss*schen Zählkammer ermittelt. Das Hämoglobin wurde nach *Sahli* bestimmt. Die Bestimmung der Erythrocytenresistenz erfolgte nach *Janowski*. Diese Methode bestimmt die osmotische Resistenz der Erythrocyten gegen eine 0,4 %ige NaCl-Lösung durch Auszählen in der *Thoma-Zeiss*schen Zählkammer. Nach *Möller* (1927) sind diese quantitativen Resistenzbestimmungen den Farbvergleichsmethoden ihrer größeren Genauigkeit wegen vorzuziehen.

Die Cholesterinbestimmungen wurden nach *Authenrieth-Funk* ausgeführt, abgeändert für kleine Mengen von *Dörle* (1923).

Versuchsprotokolle.

Serie 1. Die erste Untersuchung wurde vor der Entmilzung ausgeführt, die zweite 2 Tage nach der Entmilzung, die dritte 5 Tage nach der Entmilzung. Bei der jeweiligen Cholesterinfütterung wurde 0,1 g

Serie 1. Protokoll 1, vor Entmilzung.

Tier Nr.	Zeit	Erythrocyten Millionen	Zahl der resistenten Erythrocyten	Hämoglobin %	Cholesterin mg
1	9h	6,73	0,2	75	—
	10	Fütterung			
	2	7,2	1,8	80	—
2	9	4,82	0,3	90	—
	10	Fütterung			
	2	5,82	0,9	100	—
3	9	5,2	0,4	100	—
	10	Fütterung			
	2	6,2	1,6	100	—
	6	5,2	0,88	100	—
4	9	4,8	0,98	75	—
	10	Fütterung			
	2	5,92	1,6	89	—
	6	6,4	2,4	80	—
5	9	5,4	1,32	80	—
	10	Fütterung			
	2	7,2	1,88	80	—
	6	7,22	2,4	85	—
6	9	6,8	1,2	75	—
	10	Fütterung			
	2	7,32	4,96	85	—
	6	7,68	2,2	85	—

Tier 1, 2, 3 und 4 werden entmilzt.



Serie 1. Protokoll 2, 2 Tage nach Entmilzung.

Tier Nr.	Zeit	Erythrocyten Millionen	Zahl der resistenten Erythrocyten	Hämoglobin %	Cholesterin mg
1	9h	6,24	0,12	75	86
	10	Fütterung			
	2	6,08	0,2	75	124
	6	6,04	0,2	70	138
2	9	7,28	1,2	70	146
	10	Fütterung			
	2	6,4	0,2	70	182
	6	6,16	0,12	75	168
3	9	6,4	0,6	75	135
	10	Fütterung			
	2	5,8	0,6	75	182
	6	5,6	0,12	75	175
4	9	6,4	0,4	90	—
	10	Fütterung			
	2	5,2	0,12	75	—
	Exitus †				
5	Kontrolle				
	9	6,48	0,8	75	—
	10	Fütterung			
	2	9,2	3,2	90	—
6	Kontrolle				
	9	6,4	0,88	70	—
	10	Fütterung			
	2	8,6	3,0	90	—

Cholesterin entweder in der Form von Cholesterin-Olivenöl oder Cholesterinsubstanz auf Brot gefüttert.

Aus dieser Versuchsserie läßt sich ersehen, daß sämtliche vor der Entmilzung untersuchten Tiere eine deutliche Erhöhung der Erythrocyten, der Resistenz und des Hämoglobins auf Cholesterinfütterung zeigen. Werden diese Tiere nach der Entmilzung untersucht, so zeigt sich mit einer Ausnahme, daß die Tiere auf Cholesterinfütterung nicht mehr charakteristisch reagieren. Es findet sich keine Erhöhung der Erythrocyten, der Resistenz und des Hämoglobins, sondern meist nach der zweiten Blutentnahme deutliche Zeichen einer Abnahme der betreffenden Werte. Nur ein Tier (Protokoll 3, Tier Nr. 3) zeigt nach Cholesterinfütterung eine Zunahme der roten Blutkörper um eine Million bei unbedeutender Vermehrung von Resistenz und Hämoglobin.

Serie 2. Bei der nächsten Versuchsreihe wurden die Tiere ebenfalls zunächst vor der Entmilzung untersucht. Die zweite Untersuchung erfolgte 2 Wochen, die dritte 3 Wochen nach Herausnahme der Milz. Auch hier wurde wieder 0,1 g Cholesterin jeweils an ein Tier verfüttert.

Serie 1. Protokoll 3, 5 Tage nach Entmilzung.

Tier Nr.	Zeit	Erythrocyten Millionen	Zahl der resistenten Erythrocyten	Hämoglobin %	Cholesterin mg
1	9h	6,72	3,44	80	202
	10	Fütterung			
	2	5,92	2,88	80	245
	6	5,44	2,4	80	236
2	9	6,16	2,4	80	—
	10	Fütterung			
	2	5,6	2,0	80	—
	6	5,24	2,0	80	—
3	9	4,88	1,84	80	189
	10	Fütterung			
	2	5,92	1,92	80	246
	6	5,82	2,0	85	220
4	9	6,16	2,4	80	—
	10	Fütterung			
	2	5,6	2,0	80	—
	6	5,32	2,0	80	—
5	Kontrolle				
	9	6,8	1,2	75	—
	10	Fütterung			
	2	7,83	4,9	90	—
	6	7,42	5,1	90	—
6	Kontrolle				
	9	7,2	1,6	80	—
	10	Fütterung			
	2	8,62	2,2	90	—
	6	7,42	2,3	85	—

Bei dieser Versuchsreihe findet sich bei keinem der entmilzten Tiere eine deutliche Reaktion auf Cholesterinfütterung, abgesehen von zwei geringen Anstiegen der Erythrocytenwerte 4 Stunden nach der Fütterung um 200000, Unterschiede, die noch im Bereiche der normalen Schwankungen liegen dürften.

Serie 3. Die erste Untersuchung erfolgte auch hier wieder vor der Entmilzung. Die zweite Untersuchung 5 Wochen und die dritte 6 Wochen nach der Entmilzung. Fütterung mit je 0,1 g Cholesterin.

Mit Ausnahme von Tier Nr. 2, Protokoll 3, das auf Cholesterinfütterung 6 Wochen nach der Entmilzung mit einem Anstieg der Hämoglobinwerte antwortet, lassen sich hier bei sämtlichen übrigen Tieren keine typischen Reaktionen auf Cholesterinfütterung auslösen, sondern leichte Abnahmen der untersuchten Werte.

Tier Nr. 3, Serie 1, Protokoll 3 und Tier Nr. 2, Serie 3, Protokoll 3 zeigen in ihrem Ausfall der Erythrocyten bzw. Hämoglobinreaktion ein unregelmäßiges Verhalten, d. h. spätes Auftreten einer mehr rudi-

Serie 2. Protokoll 1, vor Entmilzung.

Tier Nr.	Zeit	Erythrocyten Millionen	Zahl der resistenten Erythrocyten	Hämoglobin %	Cholesterin mg
1	9h	5,66	0,88	80	—
	10	Fütterung			
	2	6,92	3,4	90	—
	6	6,0	1,9	90	—
2	9	5,64	0,92	90	—
	10	Fütterung			
	2	7,32	4,2	100	—
	6	6,24	3,14	90	—
3	9	5,88	1,2	80	—
	10	Fütterung			
	2	7,2	3,2	90	—
	6	6,4	2,8	—	—
4	9	5,8	1,02	80	—
	10	Fütterung			
	2	5,9	2,4	90	—
	6	6,8	3,2	90	—
5	9	5,28	1,32	80	—
	10	Fütterung			
	2	5,82	2,4	95	—
	6	5,0	1,32	90	—
6	9	6,8	1,2	75	—
	10	Fütterung			
	2	7,4	4,6	95	—
	6	8,2	4,2	90	—

Tier 1, 2, 3 und 4 werden entmilzt.

Serie 2. Protokoll 2, 2 Wochen nach der Entmilzung.

Tier Nr.	Zeit	Erythrocyten Millionen	Zahl der resistenten Erythrocyten	Hämoglobin %	Cholesterin mg
1	9h	5,76	2,0	80	112
	10	Fütterung			
	2	6,0	2,0	80	166
	6	6,12	1,9	80	160
2	9	5,72	4,0	80	—
	10	Fütterung			
	2	5,78	4,0	80	—
	6	5,84	3,7	80	—
5	Kontrolle				
	9	4,0	1,9	80	—
	10	Fütterung			
	2	6,0	3,4	100	—
6	Kontrolle				
	9	4,56	1,6	80	—
	10	Fütterung			
	2	6,2	2,72	90	—

Serie 2. Protokoll 3, 3 Wochen nach der Entmilzung.

Tier Nr.	Zeit	Erythrocyten Millionen	Zahl der resistenten Erythrocyten	Hämoglobin %	Cholesterin mg
1	9h	5,8	1,28	80	94
	10	Fütterung			
	2	5,28	0,88	75	146
	6	5,0	0,8	75	92
2	9	6,0	3,4	90	112
	10	Fütterung			
	2	5,6	2,3	80	163
	6	5,6	2,0	80	125
3	9	6,08	3,12	90	124
	10	Fütterung			
	2	5,72	1,02	80	194
	6	5,6	1,2	80	166
4	9	5,88	3,78	90	143
	10	Fütterung			
	2	6,16	1,2	80	188
	6	5,9	1,2	80	154
5	Kontrolle				
	9	5,28	1,32	80	138
	10	Fütterung			
	2	5,87	2,4	90	210
	6	5,96	2,6	90	200
6	Kontrolle				
	9	5,84	0,8	80	122
	10	Fütterung			
	2	6,88	1,2	90	202
	6	6,62	2,1	90	188

mentären Reaktion, auch in späteren Nachuntersuchungen. Die Annahme besonderer, den Milzausfall kompensierender funktioneller Vorgänge liegt nahe.

Bei den nun noch folgenden Versuchen wurden entmilzte Tiere 10 Tage lang mit je 0,1 g Cholesterin gefüttert. Die hierzu verwendeten Tiere waren vor 10 Tagen entmilzt worden.

Diese Versuche zeigen, daß auch eine längere Zeit fortgesetzte Cholesterinfütterung beim entmilzten Meerschwein keine Steigerung der Erythropoese verursacht, daß ferner eine geringe Änderung des Plasmagleichgewichtes durch Cholesterinvermehrung nicht zu einer Resistenzänderung im strömenden Blut und damit auch nicht zu einer Polyglobulie führt.

Es läßt sich also *zusammenfassend* ausführen:

Eine einmalige Cholesterinfütterung löst beim normalen Meerschweinchen Erhöhung der Erythrocyten und Hämoglobinwerte und der Erythrocytenresistenz aus.

Serie 3. Protokoll 1, vor Entmilzung.

Tier Nr.	Zeit	Erythrocyten Millionen	Zahl der resistenten Erythrocyten	Hämoglobin %	Cholesterin mg
1	9h	4,88	0,88	80	—
	10	Fütterung			
	2	5,91	1,9	95	—
	6	4,7	2,4	90	—
2	9	6,96	0,86	80	—
	10	Fütterung			
	2	7,72	1,66	90	—
	6	7,2	2,2	90	—
3	9	6,22	0,92	80	—
	10	Fütterung			
	2	7,8	3,2	95	—
	6	6,8	2,8	90	—
4	9	6,4	0,92	75	—
	10	Fütterung			
	2	7,5	3,6	95	—
	6	7,2	3,2	95	—
5	9	4,8	1,2	80	—
	10	Fütterung			
	2	6,8	3,2	100	—
	6	6,2	3,2	100	—

Serie 3. Protokoll 2, 5 Wochen nach Entmilzung. Tier 1, 2, 3 entmilzt, 4 und 5 Kontrollen.

Tier Nr.	Zeit	Erythrocyten Millionen	Zahl der resistenten Erythrocyten	Hämoglobin %	Cholesterin mg
1	9h	5,44	0,62	70	112
	10	Fütterung			
	2	5,1	0,81	70	110
	6	5,0	0,86	70	164
2	9	6,88	0,81	80	201
	10	Fütterung			
	2	5,76	0,6	80	240
	6	7,0	0,8	80	164
3	9	6,4	1,2	80	92
	10	Fütterung			
	2	6,0	1,12	80	164
	6	5,8	1,2	80	—
4	9	6,4	1,2	80	85
	10	Fütterung			
	2	6,16	1,2	75	128
	6	6,0	0,88	—	122
5	9	6,4	1,0	80	124
	10	Fütterung			
	2	7,52	3,4	90	168
	6	6,78	2,3	95	144

Serie 3. Protokoll 3, 6 Wochen nach Entmilzung.

Tier Nr.	Zeit	Erythrocyten Millionen	Zahl der resistenten Erythrocyten	Hämoglobin %	Cholesterin mg
1	9h	5,12	2,66	80	92
	10	Fütterung			
	2	4,2	2,4	80	146
	6	4,12	2,0	80	115
2	9	6,2	1,46	75	84
	10	Fütterung			
	2	6,2	1,6	90	164
	6	6,02	1,6	90	91
3	9	4,7	1,92	74	112
	10	Fütterung			
	2	4,16	2,0	75	181
	6	4,0	2,0	75	166
5	Kontrolle				
	9	4,92	0,88	80	112
	10	Fütterung			
	2	5,73	4,32	100	184
	6	6,2	3,1	100	178
6	Kontrolle				
	9	4,84	2,4	80	124
	10	Fütterung			
	2	6,82	5,2	95	156
	6	6,0	4,16	95	148

Beim entmilzten Tier tritt diese Reaktion kurze wie lange Zeit nach der Operation nach einmaliger oder längere Zeit fortgesetzter Cholesterinfütterung nicht auf. Die betreffenden Werte zeigen vielmehr überwiegend eine Verminderung. Nur ausnahmsweise treten auch bei diesen ungleichmäßige, rudimentär verlaufende Reaktionen auf. Daraus läßt sich für die Rolle der Milz folgendes sagen: Einmalige Cholesterinfütterung führt zu einer vorübergehenden Erhöhung des Cholesterinspiegels. Gleichzeitig mit dieser Cholesterinämie entwickelt sich eine vorübergehende Polyglobulie und Resistenzerhöhung der Erythrocyten. Da diese polyglobulären Reaktionen beim entmilzten Tier ausbleiben oder nur gelegentlich rudimentär in Erscheinung treten, ist anzunehmen, daß diese Reaktion an eine durch die Cholesteringaben bedingte Veränderung des Milzgewebes gebunden ist. Da wir ferner wissen, daß die Erythrocytenresistenz in der normalen Milz eine Verminderung erfährt und diese bei Cholesteringaben verhindert wird bzw. in ihr Gegenteil umschlägt, können wir auch aus dieser Erscheinung auf eine besondere Beeinflussung des Milzgewebes durch eine funktionelle Beeinträchtigung schließen. Es liegt nahe, diese Einwirkung auf die verarbeitenden Mechanismen, das retikulo-endotheliale System zu beziehen, etwa in

Tier Nr.		Erythrocyten Millionen	Zahl der resistenten Erythrocyten	Hämoglobin %	Cholesterin mg
1	entmilzt				
	vor Fütterung	5,98	1,6	80	114
	3 Tage nach Beginn der Fütterung	6,0	1,6	75	188
	6 „ „ „ „ „	6,4	1,5	80	200
	10 „ „ „ „ „	6,4	1,6	75	202
2	entmilzt				
	vor Fütterung	7,2	2,4	80	144
	3 Tage nach Beginn der Fütterung	6,8	2,0	80	223
	6 „ „ „ „ „	6,78	2,0	75	220
	10 „ „ „ „ „	6,48	2,0	80	—
3	entmilzt				
	vor Fütterung	5,8	1,8	90	92
	3 Tage nach Beginn der Fütterung	6,0	1,6	90	186
	6 „ „ „ „ „	5,9	1,8	90	200
	10 „ „ „ „ „	6,2	1,93	85	212
4	Kontrolle nicht entmilzt				
	vor Fütterung	5,76	0,88	80	98
	3 Tage nach Beginn der Fütterung	7,6	2,76	100	212
	6 „ „ „ „ „	7,8	4,6	110	222
	10 „ „ „ „ „	9,8	6,4	100	242
5	Kontrolle nicht entmilzt				
	vor Fütterung	4,8	0,6	75	84
	3 Tage nach Beginn der Fütterung	8,2	4,6	90	188
	6 „ „ „ „ „	8,8	5,32	95	224
	10 „ „ „ „ „	9,6	6,0	100	220

dem Sinne, daß bestimmte vermittelnde Aufgaben durch eine Bindung des Cholesterins vorübergehend gehemmt oder verhindert werden. Die Ausnahmefälle sprechen dafür, daß auch andere Teile des retikulo-endothelialen Apparates für die normale Reaktion in Betracht kommen. Sie scheinen aber bei der überwiegenden Zahl der Versuchstiere nicht zu genügen, um den Ausfall des Milzgewebes zu kompensieren. Ob ein späterer Ausgleich möglich ist, geht aus den Untersuchungen nicht hervor. Jedenfalls ist er hier nach 1 bis 2 Monaten noch nicht eingetreten.

Aus den Versuchen geht ferner hervor, daß eine direkte Beeinflussung des Cholesterins auf die roten Blutkörperchen oder ihre Bildungszellen im Knochenmark, ferner besondere Änderungen des Plasmagleichgewichtes durch Cholesterinvermehrung keine ausschlaggebende Rolle spielen können.

Die Versuche sprechen also dafür, daß eine Erhöhung des Cholesterinspiegels zu einer Störung der Blutmauserung durch die Milzregulation führt. Sie können darnach als eine indirekte Bestätigung

der Annahme von *Heeres* und *Bolt* dienen, daß die nach Milzexstirpation auftretende Cholesterinämie, Polyglobulie und Resistenzvermehrung der Erythrocyten gemeinsame Folgezustände der fehlenden Milzregulation sind.

Gleichzeitig scheint man anzunehmen, daß sich der Quotient Cholesterin/Phosphaten, von dem die Resistenz der Erythrocyten abhängig sein soll, wesentlich von gewissen funktionellen Leistungen der Milz oder ihres Wegfalles beeinflußt wird.

Literatur.

1) *E. E. Abelous* und *L. S. Soula*, C. r. **94**, 1926. — 2) *N. A. Bolt* und *P. A. Heeres*, Nederl. Tijdschr. voor Geenesk., Jahrg. 66, 1922. — 3) *M. Dörle*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **84**, 101, 1923. — 4) *M. Dörle* und *R. Sperling*, Klin. Wochenschr., Jahrg. 3, S. 1534, 1924. — 5) *Briand* und *Bauer*, zitiert nach *St. Weiss*. — 6) *H. Eppinger*, Die hepat. lien. Erkrankungen. Berlin, Springer, 1910. — 7) *H. Eppinger* und *H. Stöhr*, Klin. Wochenschr., Jahrg. 1, S. 1543. — 8) *G. Halfer*, Clin. ped., Jahrg. 7, S. 425, 1925. — 9) *P. A. Heeres* und *N. A. Bolt*, Nederl. Tijdschr. voor Geenesk., Nr. 20, 1923. — 10) *L. W. Hill*, Arch. of int. Med. **16**, Heft 5, 808, 1913. — 11) *E. B. Krumbhaer*, *J. H. Musser* und *M. B. Paerce*, Journ. of exper. Med. **18**, 666, 1913. — 12) *Möller*, Tagung d. nordwestdeutsch. Ges. f. inn. Med., Januar 1927. — 13) *L. D. Pel*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **106**, 592, 1912. — 14) *Pugliese* und *Lazzati*, zitiert nach *St. Weiss*. — 15) *A. Roccavilla*, Pathologica Nr. 128, 1914. — 16) *G. Roese*, Zeitschr. f. klin. Med. **102**, 454, 1926. — 17) *H. Siegmund*, Virchows Arch. **224**, Heft 3, 1917. — 18) *G. Sotti* und *O. Torri*, Arch. med. Biol. **65**, 8, 1916. — 19) *W. B. Soper*, Pathol.-anat. Beitr. **60**, Heft 2, S. 232, 1915. — 20) *Thomas* und *Lebert*, C. r. **155**, Heft 2, S. 187, 1912. — 21) *St. Weiss*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **57**, Heft 3, S. 404, 1927. — 22) *St. Weiss* und *F. Kolta*, ebendaselbst **57**, Heft 1, S. 157, 1927. — 23) *K. Ziegler*, ebendaselbst **42**, Heft 1, S. 119, 1924.

Über die Wärmetönungen der chemischen Reaktionsphasen im Muskel.

Von

Otto Meyerhof und J. Suranyi.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 14. Oktober 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Als der nach unseren bisherigen Kenntnissen wesentliche energieliefernde chemische Vorgang während der Muskelkontraktion ergab sich sowohl unter anaeroben wie aeroben Bedingungen ein Übergang von Glykogen in Milchsäure. Während anaerob die gebildete Milchsäure bestehen bleibt, verschwindet sie in Gegenwart von Sauerstoff nachträglich unter Oxydation und Resynthese zu Glykogen[1]. Während der Spaltung des Glykogens in Milchsäure werden im Muskel pro 1 g im Durchschnitt 380 bis 390 cal frei: kalorischer Quotient der Milchsäure (c. Q.). Diese Wärme unterscheidet sich nicht meßbar, ob die Milchsäure bei der Kontraktion oder während der Ruhe entsteht. Da nun in beiden Fällen der Anfangs- und der Endzustand der erschlaffte Muskel ist, beweist diese Gleichheit, daß die anaeroben energieliefernden chemischen Vorgänge während der Tätigkeit denen der Ruhe genau gleich sind. Doch ist zu beachten, daß diese Mittelzahl des c. Q. aus Versuchen mit im allgemeinen 0,15 bis 0,25 % Milchsäurebildung gewonnen ist. Bei kleinerer Milchsäurebildung ergab sich in einigen Versuchen ein größerer, bei stärkerer Milchsäurebildung ein kleinerer c. Q. Doch waren die Unterschiede bei den versuchstechnischen Schwierigkeiten nicht groß genug, um sicher auf einen Gang schließen zu lassen. Wohl aber verringerte sich der c. Q. beträchtlich, wenn ein größerer Teil der hinzugebildeten Milchsäure in die Lösung übertrat. Es fand sich 1. in zerschnittener Muskulatur, wo die Milchsäure in Phosphatlösung übertritt, ein c. Q. von 200 cal, nach Abzug der Umsatz-

[1] *O. Meyerhof*, Handb. d. Physiol. 8, 1, 476.

wärme von Milchsäure mit Phosphat 180 cal, 2. während der zweiten Periode einer anhaltenden Anaerobiose intakter Muskeln in bicarbonathaltiger Ringerlösung noch 220 cal, wobei wiederum 20 cal für die Reaktion mit Bicarbonat abzuziehen sind, so daß hier 200 cal für die Spaltung bleiben. Auch hier tritt die neugebildete Milchsäure total in die Bicarbonatlösung über.

Die Erklärung für den c. Q. war diese: Auf Grund der Verbrennungs- und Lösungswärmen von Milchsäure und Glykogen, die der eine von uns zum Teil gemeinsam mit *R. Meier* bestimmt hat[1], beträgt der Übergang von gequollenem Glykogenhydrat zu gelöster Milchsäure etwa 180 cal, also genau so viel wie die Wärmetönung der Milchsäurebildung in zerschnittener Muskulatur, wobei demnach kein weiterer Prozeß stattfindet. Der Überschuß von etwa 200 cal bei der Kontraktions- und Ruhewärmebildung im intakten Muskel konnte weiterhin zu einem erheblichen Teil auf die Reaktion gelöster Milchsäure mit Muskelprotein bezogen werden, wobei die Entionisierung des letzteren vor sich geht. Diese Entionisierungswärme beträgt für Muskelprotein pro Äquivalent 12600 cal, d. h. pro 1 g Milchsäure 140 cal, und auch das Eindringen permeierender Säuren (Valeriansäure) in den Muskel ohne gleichzeitige Milchsäurebildung ist mit einer Wärmetönung verbunden, die etwa 10000 cal pro Äquivalent beträgt, entsprechend 110 cal pro Gramm Milchsäure. Doch ist nicht der ganze Betrag der Entionisierung für den c. Q. verfügbar. Wie *O. Meyerhof* und *K. Lohmann*[2] fanden, ist im unermüdeten Muskel nur gut die Hälfte des Alkalis, das mit der Milchsäure reagiert, an Protein gebunden, der Rest an Phosphat und andere Puffersubstanzen. Statt 140 cal sind danach nur etwa 70 bis 90 cal für die Entionisierung des Proteins anzusetzen und etwa 10 cal für den Umsatz mit Phosphat und ein Betrag von 100 bis 120 cal, also fast ein Drittel des gesamten c. Q., harrt der Erklärung. Zwar erschien es möglich, daß dieser Betrag durch verschiedene Umstände verkleinert würde. Z. B. könnte das Phosphat im intakten Muskel so abgetrennt sein, daß die Milchsäure nur mit dem Eiweiß reagieren kann. Es könnte sich ferner zu der Entionisierungs- noch eine Dehydratationswärme des Eiweißes addieren, wie sie wenigstens bei schwer löslichen Aminosäuren nachweisbar war. Jedoch schlugen alle Versuche, im Modell solche Zusatzwärmen bei Eiweißlösungen zu finden, fehl[3].

---

[1] Diese Zeitschr. **129**, 594, 1923; **150**, 233, 1924.

[2] Ebendaselbst **168**, 141, 1926.

[3] Erwähnt sei, daß *E. J. Lesser* bei Vergleich von Milchsäurebildung und Wärmeproduktion des ganzen Frosches in der Anoxybiose einen ähnlichen ungedeckten Kalorienbetrag fand und danach das Bestehen eines zweiten anaerob verlaufenden exothermen chemischen Prozesses vermutete. Diese Zeitschr. **140**, 560, 1923.



Ein Weg, in dieser Richtung weiterzukommen, eröffnete sich durch die Möglichkeit, das Ferment aus dem Muskel zu isolieren[1]. Hier können die chemischen Vorgänge ohne alle Strukturbedingungen ablaufen und die von außen zugefügten Kohlehydrate, Stärke, Glykogen, Glucose, Hexosephosphorsäure, werden glatt in Milchsäure gespalten. Die Wärmetönung der einzelnen Spaltungsphasen läßt sich ohne Schwierigkeit messen. So kann ferner die Wärme der Veresterung des Glykogens mit Phosphorsäure, des Übergangs von Hexosemono- in Diphosphorsäure usw. von allen anderen Vorgängen getrennt bestimmt werden. Wenn also eine noch unbekannte chemische Reaktion mit stärkerer positiver Wärmetönung abliefe, müßte sie auf diesem Wege entdeckt werden. In der Tat gelang es so, den bisher unbekannten Restbetrag des c. Q. in Größe von gegen 120 cal aufzuklären. Überraschenderweise rührte er nicht von irgendwelchen physikalisch-chemischen Prozessen her, die durch die gebildete Milchsäure veranlaßt werden, sondern von einem Stoffwechselvorgang, dessen Entdeckung man *P.* und *G. P. Eggleton*[2], sowie unabhängig davon *Fiske* und *Subbarow*[3] verdankt. Diesen Autoren gelang der Nachweis, daß zwei Drittel bis drei Viertel des gesamten Phosphats im Muskel, das bisher als anorganisch angesprochen wurde, sich in labiler, säureunbeständiger Bindung befindet, und zwar, wie von *Fiske* und *Subbarow* festgestellt wurde, zusammen mit Kreatin. Dieser Komplex, der von *Eggleton* als „Phosphagen" bezeichnet wurde, wird unter anaeroben Bedingungen aufgespalten, langsam in der Ruhe, rasch bei Tätigkeit. Der Zerfall des „Phosphagens" in Kreatin und Phosphorsäure, über den der eine von uns gemeinsam mit Dr. *K. Lohmann* nächstens eingehender berichten wird, besitzt aber die verlangte Wärmetönung, wenn man das Verhältnis der Phosphagenspaltung zur Milchsäurebildung für die bei Messung des c. Q. eingehaltenen Bedingungen (etwa 0,2 % Milchsäurebildung) zugrunde legt[4].

---

[1] Diese Zeitschr. **178**, 395, 1926.

[2] *P.* und *G. P. Eggleton*, Biochem. Journ. **21**, 190, 1927; Journ. of Soc. Chem. a. Ind. **46**, Nr. 21, 484, 1927; Journ. of Phys. **63**, 155, 1927.

[3] Science **65**, 401, 1927.

[4] Neuere Versuche des einen von uns (*O. Meyerhof*) legen nahe, daß die „Aufspaltung" der präformierten Kreatinphosphorsäure und ebenso ihre „Resynthese" aus den Spaltprodukten im Muskel zum Teil nur auf einen Übergang aus einer stabileren in eine labilere Verbindung zurückzuführen sind und dann nicht mit derjenigen Wärmetönung verknüpft, wie sie sich aus der Spaltung des isolierten Phosphagens in vitro ergibt. In welchem Umfang dieser Befund die Deutung des kalorischen Quotienten im obigen Sinne einschränkt, wird gegenwärtig untersucht. Wir glauben jedoch, daß der Größenordnung nach die obigen Angaben zutreffend bleiben.

Außerdem schien es wichtig, die Teilprozesse der Kohlehydratspaltung zu untersuchen, um festzustellen, welche als energieliefernd in Betracht kommen.

Eine Reihe vorläufiger Versuche hierfür hat schon im Sommer 1926 Dr. *Hermann Blaschko* in unserem Institut ausgeführt.

Methodik.

Die allgemeine Methodik schloß sich der früher gebrauchten eng an[1]. In einem Teil der Versuche wurde die Temperatur thermo-elektrisch in Anlehnung an das von *A. V. Hill* beschriebene Differentialverfahren gemessen. Doch änderten wir dies dahin ab, wie es schon früher gelegentlich von dem einen von uns verwandt war: Beide *Dewar*-Gefäße hängen in einem auf 0,002° regulierten, elektrisch geheizten Thermostaten. Das Kontrollgefäß wird offen darin versenkt, während das Versuchsgefäß mit wattegefülltem Glaskragen herausragt. Das Kontrollgefäß verschafft die konstante Bezugstemperatur, die von den Oszillationen des Thermostaten unabhängig und innerhalb 0,0005° konstant ist. Für die Rechnung wird dann allein der Abkühlungskoeffizient des Versuchsgefäßes berücksichtigt.

Als Meßinstrument benutzten wir ein *Zeiss*sches Schleifengalvanometer, das in dem Kellerraum, in dem die Messungen stattfanden, auf einem Sockel aufgestellt war. Es wurde meist mit starker Vergrößerung, aber hängender Schleife benutzt und die erste Interferenzlinie mit vorgesetzter Grünscheibe abgelesen. Verbunden mit einem Thermoelement von Kupfer-Konstantan mit beiderseits zwei Lötstellen und 6 Ohm Widerstand, ergab sich bei Kommutierung eine Empfindlichkeit von 1,95 Skalenteilen pro 0,01° oder, da auf 0,2 Skalenteile gut abgelesen werden konnte, eine Genauigkeit von 0,001°. Bei stehender Schleife ist die Empfindlichkeit etwa 6 mal so groß, aber die Skalenbreite dann für die meisten Versuche zu klein, falls man nicht mit Kompensation arbeitet. Auch ist dann die Stabilität geringer. Die *Dewar*-Gefäße werden im Thermostaten geschüttelt. Die Schüttelvorrichtung ist in Abb. 1 wiedergegeben. Das Thermoelement

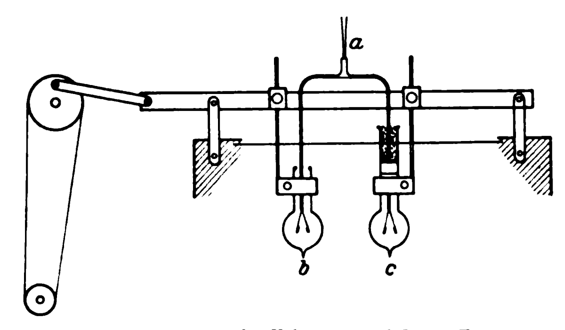


Abb. 1. Schüttelvorrichtung der Kalorimetergefäße im Thermostaten.
a: Bügelförmiges Thermoelement mit beiderseits zwei Lötstellen. *b*: Kontrollgefäß, im Thermostaten versenkt. *c*: Versuchsgefäß, mit Muskelextrakt gefüllt.

[1] *O. Meyerhof*, Abderhaldens Handb. d. Biol. Arbeitsmethod. Abt. IV, Teil 10, S. 771.

wird mit dem Galvanometer durch eine *Pohl*sche Wippe verbunden. Diese besteht aus vier mit Quecksilber gefüllten Reagenzgläschen, die in einen mit Quecksilber gefüllten *Dewar*-Becher tauchen, um sie auf konstanter Temperatur zu halten. Bei jeder Ablesung wurde kommutiert.

Der Vorteil der Anordnung gegenüber der thermometrischen Messung ist nur die etwas höhere Empfindlichkeit der Temperaturablesung. Da indes die Fehlergrenze zumeist nicht hierdurch bestimmt wird, so wurde eine größere Zahl von Messungen auch wie früher mit geprüften *Beckmann*-Thermometern vorgenommen. Wurde mit *Beckmann*-Thermometer abgelesen, so wurde ein zweites *Dewar*-Gefäß von gleichem Abkühlungskoeffizienten mit Wasserfüllung als Kontrollgefäß benutzt. Es gab den Moment an, wo die Vorperiode beendet war, d. h. der Temperaturgang dem stationären Wert des Abkühlungskoeffizienten entsprach. Diese Vorperiode beträgt bei nicht sehr abweichender Zimmertemperatur 60 bis 70 Minuten. Die Temperatur betrug für einen Teil der Versuche 20,0, für die anderen 18,6°.

In *Dewar*-Kolben von etwa 80 ccm Fassungsraum der Kugel wurden im allgemeinen 70 ccm schwach verdünnten Muskelextrakts gefüllt. Dieser wurde, falls größere Mengen Milchsäure zu erwarten waren, mit Bicarbonat versetzt, so daß die Gesamtkonzentration 0,2% $NaHCO_3$ betrug; ferner öfters auch mit Phosphat (p_H 7,4). In den ersten Versuchen wurde dauernd Stickstoff + 5% Kohlensäure durch das Gefäß geleitet, um den Kohlensäuredruck konstant zu halten und Umsatzwärmen der Kohlensäure zu verhindern. Da aber die Reaktion fast immer nach der sauren Seite verschoben wird, wurde später auf das Durchleiten von Gas überhaupt verzichtet und nur das zugefügte Kohlehydrat aus der eingehängten Pipette mit Stickstoff herausgedrückt[1]. Der Abkühlungskoeffizient der Gefäße betrug je nach der besonderen Anordnung 4,5 bis 6% pro Stunde. Der Wasserwert des leeren Gefäßes mit Thermometer (bzw. Thermoelement) in der Versuchsanordnung wurde nach dem Mischungsverfahren bestimmt; er betrug 9 ccm Wasser. Die Genauigkeit der Wärmemessungen im Beginn dieser Arbeit litt durch den Umstand, daß nur eine Vorperiode von 20 Minuten gewählt wurde, weil das Ferment bei 20° in Abwesenheit von Kohlehydrat erheblich geschädigt wird. In 20 Minuten ist aber noch kein konstanter Abkühlungswert erreicht und die empirische Korrektur der Anfangszeit nicht genau. Für die Spaltung der Glucose und für den Umsatz des Hexosemonophosphats war eine solche Abkürzung der Vorperiode unvermeidlich, weil diese beiden Reaktionen am empfindlichsten sind. Dagegen ließ sich bei den übrigen, insbesondere in mit destilliertem Wasser hergestellten Extrakten auch nach einer Wartezeit von 70 Minuten noch ein recht beträchtlicher Umsatz erzielen, so daß wir hier die Versuche mit längerer Vorperiode wiederholten und die vorangegangenen nur als orientierend betrachten.

Eine andere Komplikation besteht bei größeren Umsätzen in der Reaktionsverschiebung nach der sauren Seite, die einmal durch Milchsäurebildung und dann durch gleichzeitige Veresterung hervorgerufen wird. Die Lösung enthält aber nicht unbeträchtliche Mengen Eiweiß, die zum Teil an der Pufferung teilnehmen, so daß ein gewisser Betrag von Eiweiß-Dissoziationswärme auftritt. Die Größe des Gesamtbetrages der Neutrali-

---

[1] *O. Meyerhof*, Pflügers Arch. **195**, 46, 1922.



sationswärme haben wir dadurch ermittelt, daß Extrakt ohne Kohlehydrat im Kalorimeter mit so viel Milchsäure versetzt wurde, als in den Versuchen gebildet wird. Die so gemessenen Wärmen wurden von denen im Hauptversuch in Abzug gebracht. Um auch bei der Säuerung durch Veresterung die Wärme der Eiweiß-Neutralisation zu kennen, wurde in Kontrollversuchen einbasisches Phosphat in den Extrakt gegeben, so daß eine p_H-Änderung von gleicher Größe eintrat. Hier muß dann die ganze Reaktionswärme auf Eiweißentionisierung bezogen werden. Diese Kontrollmessungen wurden nicht für jeden Einzelversuch angestellt (der jedesmal 80 ccm Extrakt aus 100 g Froschmuskel benötigt), sondern nur für die meist vorkommenden p_H-Verschiebungen, und die anderen Werte interpoliert.

Die chemischen Bestimmungen geschahen ähnlich wie bei den übrigen Arbeiten. Die Milchsäure wurde nach Enteiweißung mittels Natriumwolframat und Schwefelsäure (*Folin-Wu*), Entzuckerung nach *van Slyke* und *Clausen* nach dem Verfahren von *Fürth-Charnas* und *Clausen* bestimmt, mit den im hiesigen Institut benutzten Verbesserungen[1]. Entsprechend den Erfahrungen von *F. Lipmann* in diesem Institut wurde in Gegenwart von Fluorid nach Zusatz des Kupferkalkes mindestens 5 Stunden bis zur Filtration gewartet, um Milchsäureverluste zu vermeiden. Der Zucker wurde im Folin-Wu-Filtrat nach *Bertrand* und *Michaelis* bestimmt.

Die p_H-Messung geschah mit der Wasserstoffelektrode, in einzelnen Fällen mit der Chinhydronelektrode.

Die Phosphatbestimmungen geschahen kolorimetrisch. Wurde nur die Änderung des stabilen Phosphorsäureesters verfolgt, so wurde genau nach der Vorschrift von *K. Lohmann* und *L. Jendrassik* nach der *Briggs-Fiske*-Methode gearbeitet[2]. Wurde auch der Umsatz des Phosphagens studiert, so wurde eine bestimmte Menge Extrakt (2 ccm) in eisgekühlte 4 %ige Trichloressigsäure (10 ccm) einpipettiert, sofort unter Eiskühlung filtriert und ein gewisser Teil (5 ccm) in Röhrchen aus Jenaer Glas eingefüllt, die mit Magnesiumzitratlösung nach *Mathison* (5 ccm) gefüllt waren[3]. Durch die Alkalisierung wird das Phosphagen stabilisiert. Der Phosphatniederschlag setzt sich in 15 Stunden ab. Er wird in den Jenaer Röhrchen 15 Minuten zentrifugiert, um am Boden festzuhaften, dann die Flüssigkeit mit einem unten gebogenen Röhrchen abgehebert und der Niederschlag noch einmal mit verdünntem Ammoniak auf der Zentrifuge gewaschen, schließlich in Molybdat-Schwefelsäure gelöst und mit der Lösung die kolorimetrische Bestimmung nach *Fiske* ausgeführt. Dagegen wird in einem anderen Teil des Trichloressigsäurefiltrats die direkte Bestimmung der Phosphorsäure nach *Fiske* vorgenommen. Die Differenz beider Bestimmungen ergibt den Phosphagengehalt.

---

[1] In den letzten Bestimmungen wurden auch die Verbesserungsvorschläge von *Friedemann, Cotonio* und *Shaffer* (Journ. Biol. Chem. **78**, 335, 1927) berücksichtigt, Mangansulfatzusatz mit stärkerer Schwefelsäurekonzentration. Unter diesen Umständen ist die Destillation ohne Änderung der Ausbeute (etwa 98 % bei 0,5 bis 2 mg Milchsäure) nach etwa 10 Minuten beendet.

[2] *K. Lohmann* und *L. Jendrassik*, diese Zeitschr. **178**, 419, 1926.

[3] Biochem. Journ. **4**, 233, 1909.

Fehlergenauigkeit.

Die chemischen Bestimmungen, Milchsäure, Glucose, Phosphat, dürften auf etwa 2 bis 3 % genau sein. Größer ist dagegen die Fehlerbreite der Wärmemessungen, die abhängt 1. von dem absoluten Betrag der Temperaturerhöhung; 2. von der Genauigkeit der Übereinstimmung der Versuchstemperatur mit der Thermostatentemperatur. Ein schwer abschätzbarer Fehler kann ferner dadurch entstehen, daß in der Vorperiode der Messungen die Kontrollprobe in nicht ganz kohlehydratfreien Extrakten einen Umsatz zeigt, der mit dem der Versuchslösung nicht vollkommen genau übereinstimmt. Der erstgenannte Fehler spielt nur bei sehr kleinen Umsätzen eine Rolle; da bei der Genauigkeit der Temperaturablesung von 0,001° die mögliche Fehlerbreite der Messung 0,002° beträgt, so begrenzt diese bei der Bestimmung der Wärmen der Hydrolyse und Veresterung die Genauigkeit, da hier die Temperaturanstiege nur 0,01 bis 0,02° betragen. Was den zweitgenannten Fehler anbelangt, so kann der Abkühlungskoeffizient der Gefäße in der Versuchszeit um etwa ± 1 % schwanken (d. h. zwischen 4 und 6 %), also um ein Fünftel seiner Größe. Beträgt die Korrektur für Abkühlung nicht mehr als 20 % des beobachteten Temperaturanstieges, so entsteht hierdurch ein Fehler von nicht über 4 %. Diese Bedingung läßt sich in fast allen Versuchen erfüllen. Um den Fehler, der aus dem Kohlehydratumsatz während der Vorperiode entstehen kann, zu vermeiden, wurde in den letzten Versuchen die Vorprobe, die zur Milchsäureanfangsbestimmung dient, direkt aus dem Kalorimetergefäß entnommen, mittelst einer in dem Stopfen befindlichen Pipette. Bei den Versuchen mit verkürzter Vorperiode und mit dest. Wasserextrakt kommt schließlich noch der späterhin zu besprechende Zerfall einer gewissen, nicht genau feststellbaren Menge präformierten Phosphagens als Ursache von Wärmebildung hinzu. Jedoch wurde der dadurch entstehende Fehler in allen späteren Versuchen nach Möglichkeit ausgeschaltet.

Ausführung der Messungen.

Die Messungen werden in folgender Reihenfolge mitgeteilt:

1. Neutralisationswärmen
   a) der Milchsäure,
   b) des KH_2PO_4.
2. Die Hydrolysenwärme des Glykogens.
3. Veresterungswärmen
   a) des Glykogens,
   b) des Hexosemonophosphats.
4. Spaltungswärme der Hexosediphosphorsäure.
5. Spaltungswärme des Glykogens.
6. Spaltungswärme der Glucose.
7. Zerfall des Phosphagens.

1a. Neutralisationswärme der Milchsäure.

Es seien zunächst die Messungen der Neutralisationswärme beschrieben, die für solche p_H-Verschiebungen und Milchsäuremengen bestimmt wurden, wie sie in den Versuchen selbst vorkamen. Um in den Kaliumchloridextrakten jede Milchsäurebildung in der Meßperiode zu verhindern, wurden sie durch 20 Minuten langes Erwärmen auf 38° inaktiviert. 3 ccm einer Milchsäure von titriertem Gehalt wurden nach Temperaturausgleich aus einer im Dewargefäß hängenden, gebogenen Pipette mit Stickstoff herausgedrückt. Die Änderung des p_H wurde mit der Chinhydronelektrode gemessen. Eine Übersicht ist in der folgenden Tabelle I enthalten. In einzelnen Fällen wurde nach dem Versuch der angesäuerte Extrakt durch Zusatz der berechneten Menge Natronlauge wieder auf den Ausgangswert gebracht, dann abermals neutralisiert. Diese Versuche sind unter der gleichen Nummer mit b) bezeichnet. Wie zu erwarten war, sinkt die Neutralisationswärme pro 1 g Milchsäure mit steigender Milchsäuremenge, in noch stärkerem Maße aber bei Zusatz von Phosphat oder Bicarbonat zum Extrakt. Vgl. hierzu besonders Versuch 3 und 4, die mit steigenden Phosphatzusätzen ausgeführt sind.

Tabelle I.

Neutralisationswärme der Milchsäure in inaktiviertem Extrakt.

Nr.	Datum	Milchsäurezusatz mg	Gesamtflüssigkeit ccm	Unverdünnt. Extrakt ccm	Zusätze P = Phosphatgemisch B = Bicarbonat	Gesamtgehalt P_2O_5 mg	p_H vorher	p_H nachher	Kalorien gebildet	Kalorien pro g Milchsäure
1	19. XI.	45	70	64	3 ccm 0,13 m P	80	7,14	6,96	2,10	46,7
1b	19. XI.	90	78	64	3 „ 0,13 m P	80	7,15	6,62	3,15	35,0
2	27. XI.	54	78	58	—	47,4	7,18	6,79	2,43	45,0
3	29. XI.	54	70	67	—	39,4	7,16	6,51	2,43	45,0
3b	29. XI.	54	80	68,5	6 ccm 0,13 m P	98,0	7,22	6,90	1,94	36,0
3c	30. XI.	54	72	59	6 „ 0,13 m P	102,0	7,12	6,86	1,8	33,0
3d	30. XI.	54	76	56	10 „ 0,13 m P	145,0	7,18	7,00	1,6	25,5
4	1. XII.	54	70	67	—	41,0	7,08	6,46	2,6	48,0
4b	1. XII.	54	80	61	10 ccm 0,13 m P	142,0	7,19	6,72	1,35	25,0
5	5. I.	28	79	76	—	36,4	6,88	6,57	1,24	47
5b	5. I.	28	82,2	76	—	35	6,92	6,60	1,19	44
6	7. I.	90	83,6	70	0,6 ccm 1,5 m P 0,4 % B	70	7,62	6,88	2,87	31
6b	7. I.	90	83,5	70	0,6 ccm 1,5 m P 0,4 % B	70	7,56	6,81	2,87	31

Die Neutralisation einer gleichen Milchsäuremenge in überschüssiger reiner Phosphatlösung (126 mg P_2O_5 auf 54 mg Milchsäure) ergab 20 bis 22 cal pro 1 g Milchsäure.

1b. Neutralisationswärme mit saurem Phosphat.

Um auch einen Anhaltspunkt für die Entionisierungswärme des Eiweißes zu haben, die bei der Veresterung von Phosphat auftritt, wobei sich ja die Reaktion stets nach der sauren Seite verschiebt[1], wurde der Extrakt statt mit Milchsäure mit saurem Kaliumphosphat versetzt. Die hierbei auftretende Wärme ist auf die Differenz der Dissoziationswärme des Eiweißes und der des Phosphats zu beziehen, analog der Reaktion, die bei konstanter Menge Alkalikation sich im eiweißhaltigen Extrakt während der Phosphatveresterung abspielt. Das Resultat eines solchen Versuchs ist das folgende:

Versuch 1 vom 4. Dezember 1926. Zusatz 3 ccm mol. KH_2PO_4 zu 67 ccm Extrakt. p_H-Verschiebung von 7,12 auf 6,86, gebildet 1,66 cal. Die Wärmetönung entspricht etwa der einer gleichen p_H-Verschiebung durch Milchsäure bei sehr hohem Phosphatgehalt.

2. Hydrolysenwärme des Glykogens.

Bereits in älteren Versuchen wurde die Wärmetönung der enzymatischen Hydrolyse des Glykogens gemessen[2]; die Spaltung war mit Taka-Diastase und Malz-Diastase vorgenommen, das Verhältnis von Maltose zu Glucose auf indirektem Wege ermittelt. Es ergaben sich 8 bis 10 cal pro 1 g reduzierenden Zuckers (berechnet für Glucose). Es erschien jedoch erwünscht, die Hydrolyse durch das Muskelenzym selbst zu bewirken und auf diese Weise erstens die Korrektur zu kennen, die bei überschüssiger Verzuckerung des Glykogens bei den später mitzuteilenden Versuchen der Glykogenspaltung anzubringen war, wie auch andererseits den Vorgang im lebenden Muskel dadurch genauer zu imitieren. Wie in den vorangehenden Arbeiten festgestellt wurde[3], wird der Muskelextrakt durch 20 Minuten langes Erwärmen auf 37° zur Milchsäurebildung unfähig, während er Glykogen fast unverändert gut hydrolysiert. Es entsteht ein Gemisch verschiedener reduzierender Saccharide, bis zur Glucose. Das Resultat der Versuche ist in der folgenden Tabelle II enthalten. Zwei orientierende Versuche mit größerem Umsatz ergaben eine etwas höhere Wärmetönung; doch wurde in diesen die etwa noch gebildete Milchsäure nicht mitbestimmt. Es sind daher nur die drei späteren, genaueren, angegeben, und wir verwenden als Durchschnitt 13 bis 14 cal pro 1 g reduzierenden Zuckers, berechnet für Glucose. Die Zuckerbestimmungen wurden sämtlich nach *Bertrand* ausgeführt, so daß nur die Zahl der reduzierenden Gruppen bestimmt worden ist[4].

---

[1] Vgl. *O. Meyerhof* und *J. Suranyi*, diese Zeitschr. **178**, 427, 1926.
[2] *O. Meyerhof*, Pflügers Arch. **204**, 295, 1924.
[3] *K. Lohmann*, diese Zeitschr. **178**, 444, 1926.
[4] Vgl. *K. Lohmann*, a. a. O.



Tabelle II.
Hydrolysenwärme des Glykogens.

A. Wärmemessungen.

Nr.	Datum 1927	Gesamtflüssigkeit ccm	Unverdünnt. Extrakt ccm	Glykogenzusatz mg	Versuchszeit	Temperaturanstieg beobachtet	Temperatur korrigiert	Kalorien gebildet
1	18. V.	72	69	300	$3^h30'$	0,011	0,014	1,13
2	19. V.	72	69	300	4^h	0,014	0,016	1,3
3	20. IX.	82	76	240	4	0,022	0,021	1,91

B. Chemische Bestimmung und Berechnung.

Nr.	Glucose vorher mg	Glucose nachher mg	Milchsäure vorher mg	Milchsäure nachher mg	Kalorienkorrektur für Milchsäure	Kalorien für Glykogenhydrolyse	Kalorien pro g Zucker (ber. für Glucose)
1	etwa 15	83	15,0	16,5	0,30	0,83	12
2	etwa 15	115	4,05	3,90	0	1,3	13
3	3,0	90	13,3	17,0	0,74	1,17	13,5

Aus der Differenz der Verbrennungswärme von gelöstem, verdünntem Glykogenhydrat (3782 cal) und gelöster verdünnter Glucose (3756 bis 3760 cal)[1] würden sich etwa 25 cal ergeben. Doch ist diese Zahl natürlich nicht sehr genau[2]; andererseits aber auch ist der in unseren Versuchen bestimmte reduzierende Zucker nicht sämtlich Glucose.

3a. Veresterungswärme des Glykogens.

Die Veresterung der Glykogenspaltprodukte mit Phosphat nach der Formel

$$C_6H_{10}O_5 + H_2O + 2\,H_3PO_4 = C_6H_{10}O_4\,.\,(PO_4H_2)_2 + 2\,H_2O$$

läßt sich von der Aufspaltung des Esters in Milchsäure und Phosphorsäure trennen mittels der von *Embden* entdeckten Wirkung des Natriumfluorids. Die von uns benutzte Fluoridkonzentration betrug 0,1 bis 0,2 m, wodurch die Milchsäurebildung des Extraktes fast vollkommen aufgehoben wird. Die Milchsäure wurde bestimmt und für die geringfügige Zunahme eine Korrektur angebracht. Die Hydrolyse des Glykogens

[1] *R. Meier* und *O. Meyerhof*, diese Zeitschr. **150**, 233, 1924.

[2] Unter Berücksichtigung der Werte von *Ginsberg* (Dissertation Braunschweig 1923) und *Stohmann* und *Schmidt* (Journ. f. prakt. Chem. (2) **50**, 385, 1894) ist vielleicht die Verbrennungswärme des Glykogens noch 10 bis 15 cal kleiner als hier angenommen. Der von *Schulte* (Pflügers Arch. **166**, 32, 1917) bestimmte Wert der Verbrennungswärme von Ascaris-Glykogen von 4127 cal pro 1 g wasserfreie Substanz ($C_6H_{10}O_5$) also 3720 cal pro 0,9 g dürfte zu niedrig sein.

wird dagegen durch Fluorid nicht gehemmt. Es muß daher auch die Zunahme des reduzierenden Zuckers gemessen werden und ebenfalls hierfür eine Korrektur in Abzug gebracht werden. Ein Teil des reduzierenden Zuckers ist jedoch Hexosediphosphat selbst, dessen Reduktionswert sich zu 1/2,37 desjenigen von Glucose ergab[1], so daß dieser Betrag leicht zu berechnen und von dem überschüssigen Zucker in Abzug zu bringen ist. Tatsächlich macht die Korrektur für die Zuckerhydrolyse nebst der spurenhaften Milchsäurebildung etwa die Hälfte der ganzen beobachteten Wärme aus, und der Rest entspricht ungefähr der Zunahme der Azidität des Extraktes. Waren doch in dem obigen Modellversuch für eine Verschiebung von 0,26 p_H 1,66 cal aufgetreten.

Tabelle III.

Veresterungswärme des Glykogens.

A. Wärmemessung.

Nr.	Datum 1927	Gesamtflüssigkeit ccm	Unverdünnt. Extrakt ccm	Glykogenzusatz mg	NaF-Konzentration	Phosphatzusatz	Zeit	Temperaturanstieg beobachtet °C	Korrigierter Temperaturanstieg °C	p_H vorher	p_H nachher	Kalorien gebildet
1	20. V.	77	60	240	0,2 m	2 ccm m/2	2h30'	0,026	0,023	6,91	6,80	1,98
2	21. V.	76	60	240	0,12 m	2 „ m/2	2h	0,020	0,023	7,42	6,87	1,96
3	23. V.	74	59	240	0,12 m	1,5 „ m/2	2h30'	0,014	0,018	7,25	6,73	1,50

B. Chemische Bestimmung und Berechnung.

Nr.	P_2O_5 vorher mg	P_2O_5 nachher mg	Verestertes Glykogen in mg Zucker	Hydrolysenüberschuß in mg Glucose	Milchsäure vorher mg	Milchsäure nachher mg	Kalorien für Hydrolyse	Kalorien für Milchsäure	Kalorien für Veresterung	Kalorien pro g Zuckerveresterung
1	88,2	64,6	30,2	47	9,2	1,09	0,70	0,34	0,94	**31**
2	97,7	48,1	63	43,5	4,7	4,1	0,65	—	1,31	**21**
3	74	35,3	47	50	7,18	9,0	0,75	0,36	0,40	**9**

3b. *Veresterungswärme des Hexosemonophosphats.*

Die Veresterung des Hexosemonophosphats läßt sich in ähnlicher Weise wie die des Glykogens studieren auf Grund der Beobachtung[1], daß dieses sich im Extrakt in Hexosediphosphat umlagert unter teilweisem Zerfall in Milchsäure, wobei ein Zusatz von Natriumfluorid die Milchsäurebildung vollständig unterdrücken kann, während die

[1] *O. Meyerhof* und *K. Lohmann*, diese Zeitschr. **185**, **113**, **1927**.

Umlagerung in Hexosediphosphat weiter geht[1]. Als Hexosemonophosphat benutzten wir den *Neuberg*schen Ester, der von Dr. *Lohmann* hergestellt wurde[2]. Da die Umwandlung des Monophates empfindlicher als die des Glykogens ist, ließen sich diese Versuche nur mit einer Vorperiode von 20 Minuten ausführen, wodurch die gemessene Wärme leicht etwas zu hoch ausfällt (siehe unten). Unter Berücksichtigung dieses Umstandes kann man praktisch die Veresterungswärme des Hexosemonophosphats gleich der des Glykogens annehmen, bezogen auf gleiche Mengen Hexosediphosphorsäure[3], und

Tabelle IV.

Umsatzwärme des Hexosemonophosphats.

A. Wärmemessung.

Nr.	Datum 1926	Gesamtflüssigkeit ccm	Unverdünnt. Extrakt ccm	Phosphatzusatz	Zeit	Temperaturanstieg beobachtet °C	Temperaturanstieg korrigiert °C	p_H vorher	p_H nachher	Kalorien gebildet
1	10. XI.	70	49	3 ccm m/4	2h	0,017	0,029	7,17	6,93	2,3
2	13. XI.	70	57	3 „ m/4	2h25′	0,029	0,036	7,11	6,86	2,94

B. Chemische Bestimmung und Berechnung.

Nr.	P_2O_5 vorher mg	P_2O_5 nachher mg	Hexosediphosphat synthetisiert in mg Zucker	Milchsäure vorher mg	Milchsäure nachher mg	Kalorien für Milchsäure	Kalorien pro g veresterten Zuckers
1	82,3	54,4	71	19,1	20,0	0,20	**29,5**
2	93,2	62,1	79,5	21,4	21,0	0	**37**

[1] Die spontane und direkte Umwandlung der natürlichen Hexosemonophosphorsäuren von *Neuberg* und *Robison* durch die Enzyme des Muskel- und Hefeextraktes ist zuerst beschrieben worden in einem zusammenfassenden Aufsatz von *O. Meyerhof* in den „Naturwissenschaften" **14**, **1175**; (Festheft der Kaiser Wilhelm-Gesellschaft, 11. XII. 1926), unter Bezugnahme auf *Embdens* Beobachtung, wonach sein „Lactacidogen" ebenfalls eine Hexosemonophosphorsäure sei. Etwas ausführlicher ist der gleiche Vorgang, ebenso die Wirkung des Natriumfluorids auf diesen Prozeß, in einer Zuschrift an die „Naturwissenschaften" 14, Heft 52, S. 1278, 1926 enthalten. Diese Umlagerung des Hexosemonophosphats stellt gegenüber der von *Embden* beschriebenen Wirkung des Fluorids auf die Veresterung des Glykogens schon darum ein prinzipiell neues Faktum dar, als die Umwandlung des Mono-Esters in Di-Ester auch ohne Zusatz von Fluorid vonstatten geht. Es ist daher nicht zutreffend, wenn *Embden* und *Zimmermann* schreiben (Zeitschr. f. physiol. Chem. **167**, 131, Anm., 1927), „daß diese Beobachtung in enger Anlehnung an ihre Fluoridzusatzversuche" erfolgt sei.

[2] *O. Meyerhof* und *K. Lohmann*, diese Zeitschr. **185**, 116, 1927.

[3] Der Bildung von 1 Mol. Hexosediphosphat entspricht hier 1 Mol. verbrauchter anorganischer Phosphorsäure, dagegen beim Glykogen 2 Mol. anorganischer H_3PO_4.

ganz oder nahezu auf die durch die Aziditätszunahme bedingte Entionisierung von Muskelprotein beziehen.

4. Spaltungswärme der Hexosediphosphorsäure.

Es sei zunächst von den Wärmemessungen der Milchsäurebildung die Spaltung des Hexosediphosphats mitgeteilt, das im allgemeinen in äquimolekulare Mengen Milchsäure und Phosphorsäure zerfällt. Das von *Bayers* Farbwerken gelieferte Magnesium-Hexosediphosphat[1] enthält eine gewisse Menge Monophosphat. Jedoch wird das gereinigte Salz meist langsamer umgesetzt, so daß wir in der Regel das käufliche Magnesiumsalz benutzten. Eine Reihe vorläufiger Versuche mit verkürzter Vorperiode geben wir nicht wieder, sondern nur zwei mit einstündiger Vorperiode, einen von diesen mit destilliertem Wasserextrakt, den anderen mit KCl-Extrakt. In beiden Fällen wurde Bicarbonat in der Konzentration von 0,25 % hinzugegeben, um die Pufferkapazität zu vermehren. Die Lösung wurde mit Stickstoff-Kohlensäure gesättigt.

Tabelle V.

Spaltungswärme der Hexosediphosphorsäure.

A. Wärmemessung.

Nr.	Datum	Gesamtflüssigkeit ccm	Unverdünnt. Extrakt ccm	Magnesiumhexosephosphat mg	Bicarbonatkonzentration %	Zeit	Temperaturanstieg beobachtet °C	Temperaturanstieg korrigiert °C	p_H vorher	p_H nachher	Kalorien gebildet
1	2. VI.	70	61 (dW)	240	0,26	3h	0,163	0,187	7,96	7,08	14,75
2	13. IX.	79	69 (KCl)	240	0,26	3	0,127	0,1405	7,54	7,06	12,36

B. Chemische Bestimmung und Berechnung.

Nr.	P_2O_5 vorher mg	P_2O_5 nachher mg	Daraus Zucker gespalten mg	Milchsäure vorher mg	Milchsäure nachher mg	Milchsäurezunahme mg	Kalorien pro g Milchsäure
1	42,3	85,3	55,0	33,9	102,2	68,3	**216**
2	55,3	94,8	50,6	19,0	72,5	53,5	**231**

5. Spaltungswärme des Glykogens.

Die Größe der Spaltungswärme des Glykogens ist, wie schon in der Einleitung hervorgehoben, von entscheidender Bedeutung für die Aufklärung der Kontraktionswärme. Da die Veresterung nur eine Wärmebildung zeigt, die auf die gleichzeitige Eiweißentionisierung be-

[1] Wir sind *Bayers* Farbwerken (J. G. Farbenindustrie) für die Überlassung einer größeren Menge Hexosediphosphat zu Dank verpflichtet.

zogen werden kann, so muß die Wärmetönung der Glykogenspaltung und der Spaltung des Hexosediphosphats gleich sein, wenn man die durch die Aziditätszunahme bedingte Wärmetönung abzieht. Die Säuerung bei der Glykogenspaltung ist aber nicht so groß, wie sich aus der bei der Veresterung (mit NaF) bestimmten plus derjenigen der Spaltung des Hexosephosphats berechnet; denn in Gegenwart von Fluorid wird die Dissoziationskonstante der Hexosediphosphorsäure und damit auch die Aziditätszunahme im Extrakt vergrößert[1]. Andererseits ist bei dem Umsatz des Glykogens die zusätzliche Veresterung und Hydrolyse zu berücksichtigen. Die Ergebnisse von 7 Versuchen mit dW-Extrakt sind in der folgenden Tabelle VI enthalten.

Tabelle VI.

Wärmetönung der Spaltung des Glykogens.

A. Wärmemessung.

Nr.	Datum	Gesamtflüssigkeit ccm	Unverdünnt. Extrakt ccm	Glykogenzusatz mg	Phosphatzusatz	Bicarbonatkonzentration %	Zeit	Temperaturanstieg beobachtet °C	Temperaturanstieg korrigiert °C	p_H vorher	p_H nachher	Kalorien gebildet
1	27. V.	76	63	300	1,5 ccm m/2	0,3	2h30′	0,313	0,339	7,49	6,88	28,8
2	30. V.	88	71	380	1,5 „ m/2	0,27	4h	0,335	0,368	7,53	6,46	35,7
3	13. VI.	88	74	380	1,5 „ m/2	0,25	4	0,303	0,312	7,48	6,44	30,3
4	9. II.	77,5	68	240	0,5 „ m/5	0,4	4h10′	0,191	0,176	7,40	6,59	15,2
5	11. II.	78,5	69	240	0,5 „ m/5	0,4	5 5	0,223	0,268	7,62	6,42	23,4
6	14. II.	80	70,5	240	0,5 „ 1,5m	0,4	5h	0,271	0,249	7,74	6,65	22,2
7	26. IX.	79	67,5	240	2,0 „ m/2	0,25	5	0,292	0,297	7,09	6,56	26,1

B. Chemische Bestimmung und Berechnung.

Nr.	P_2O_5 vorher mg	P_2O_5 nachher mg	Zucker verestert mg	Überschuß der Zuckerhydrolyse mg	Milchsäure vorher mg	Milchsäure nachher mg	Milchsäurezunahme mg	Kalorien für Hydrolyse	Kalorien für Veresterung	Kalorien für Milchsäure	Kalorien pro g Milchsäure gebildet
1	92	75,5	21,5	12	28,7	160	131,3	0,15	0,3	28,35	216
2	113	76,5	46,5	30	37	206	169	0,45	0,7	34,55	204
3	109	107	2,5	96	21	185	164	1,35	0	28,95	177
4	76,8	67,0	12,5	109	19,9	84,6	64,7	1,5	0,15	13,55	210
5	80,2	77,6	3,3	90,0	14,9	122,1	107,2	1,26	0	22,15	206
6	79,9	71,4	10,9	89,1	17,9	117,9	100,0	1,25	0,15	20,8	208
7	103,3 (18,3)*	78,2 (7,5)*	32	96	50,5	156,5	106,0	1,35	0,48 (2,2)*	22,05	208
										Durchschnitt:	204

* Die eingeklammerten Zahlen geben den Phosphagengehalt (in mg P_2O_5) und die für dessen Spaltung berechnete Wärmetönung (in cal) an.

[1] *O. Meyerhof* und *J. Suranyi*, diese Zeitschr. **178**, 427, 1926.

Um den Wärmebetrag zu bestimmen, der für die Neutralisation der Milchsäure und die Aziditätszunahme der überschüssigen Veresterung in Abzug zu bringen ist, benutzten wir die oben in Tabelle I angegebenen Modellversuche. Die durchschnittliche Milchsäurebildung von 120 mg ist höher als in den höchsten der dort verzeichneten Versuche. Die Pufferung durch Bicarbonat und Phosphat entspricht etwa dem Versuch Tabelle I, Nr. 6. Die Neutralisationswärme pro Gramm Milchsäure ist danach höchstens 31 cal, andererseits aber über 25 cal, weil dieser letztere Wert sich bei dem höchsten Phosphatgehalt ergab. Wir rechnen mit einem Durchschnittswert von 28 cal. Die zusätzliche Veresterung ist im allgemeinen in den Versuchen klein, weil sie so lange fortgesetzt wurden, daß das angehäufte Hexosediphosphat wieder zum größten Teil gespalten wurde. Setzen wir die Aziditätszunahme durch Veresterung gleich drei Viertel derjenigen in Gegenwart von Fluorid, so ergeben sich etwa 15 cal pro Gramm veresterten Zuckers. Daraus folgen die in der drittletzten Spalte angegebenen Werte. Während im allgemeinen in der benutzten Vorperiode von 60 bis 80 Minuten die im Extrakt enthaltene Kreatinphosphorsäure aufgespalten wird, ist dieser Zerfall während der Messungszeit in den Extrakten aus Muskeln frischer Herbstfrösche nicht zu vernachlässigen, da diese reichlich präformiertes Glykogen enthalten, welches die Kreatinphosphorsäure für längere Zeit konserviert. In Versuch 7, Tabelle VI wurde die in die Meßperiode fallende Spaltung der Kreatinphosphorsäure bestimmt und auf Grund der Messungen des nächsten Kapitels dafür ein Wärmebetrag in Abzug gebracht. Dieser macht hier etwa 10 % der gesamten Wärme aus. Leider ist die Aufspaltung der Kreatinphosphorsäure in den übrigen Versuchen nicht bestimmt worden, weil sich in einigen Versuchen im Frühjahr eine völlige Aufspaltung in der Vorperiode ergeben hatte. Es ist daher möglich, daß in mehreren der übrigen Versuche der Wärmewert pro Gramm Milchsäure noch um einige Kalorien verkleinert werden müßte. Ohne Rücksicht auf diesen Umstand ergibt sich als Mittelwert der 7 Versuche 204 cal pro Gramm Milchsäure und nach Abzug der Neutralisationswärme 176 cal. Die berechnete thermochemische Differenz von gelöstem Glykogen und verdünnter Milchsäure beträgt, wie oben angegeben, 182 cal und stimmt also sehr gut mit der direkt gemessenen Wärme überein.

Nachdem kürzlich von *Neuberg* und *Kobel* gezeigt ist[1], daß durch lebende Hefe aus Methylglyoxal l-Milchsäure entsteht, durch Hefeextrakt dagegen racemische, interessierte uns, ob das gelöste Muskelenzym dieselbe d-Milchsäure bildet, wie die Muskulatur selbst. In

[1] *Neuberg* und *Kobel*, diese Zeitschr. 182, 470, 1927.



Versuch 2 und 3, Tabelle VI, wurde deshalb ein Teil des Fermentgemisches am Schluß nach *Schenck* enteiweißt, mit Äther extrahiert und aus dem Ätherrückstand in der üblichen Weise das Zinklactat dargestellt. In Versuch 2 wurden 87 mg des kristallisierten Zinklactats in 2,5 ccm Wasser gelöst (= 3,48 %) und im 1-d-Rohr beobachtet. Erhalten: $\alpha = -0{,}25^0$; daraus: $[\alpha_D]$ für kristallisiertes Zinklactat $-7{,}2^0$. Chemische Milchsäurebestimmung in 1 ccm der zwanzigfach verdünnten Lösung. Erwartet: 1,12 mg; gefunden: (ohne Korrektur) 1,10 mg = 98 %.

Aus Versuch 3 wurden 81,7 mg kristallisiertes Zinklactat in 2 ccm Wasser gelöst = 4,08 %; im 1-d-Rohr $\alpha = -0{,}285^0$ $[\alpha_D] = -7{,}0^0$; Wassergehalt 11,25 % (theoretisch 12,88 %). Chemische Milchsäurebestimmung: 72,5 mg des wasserfreien Salzes in 25 ccm Wasser gelöst, 1 ccm benutzt, erwartet 2,14 mg, gefunden (ohne Korrektur) 2,16 mg = 101 %.

Die Drehung stimmt genau mit der theoretischen für die gleiche Konzentration überein[1]; es entsteht also ausschließlich d-Milchsäure.

6. *Spaltungswärme der Glucose.*

Die Spaltungswärme der Glucose unter Zusatz von Hefeaktivator wurde nur in einigen Versuchen mit verkürzter Vorperiode bestimmt, wodurch die Wärme wegen des in die Meßperiode fallenden schwankenden Betrages der Phosphagenspaltung und wegen ungenügenden Temperaturausgleichs meist etwas zu hoch ist. Der Hefeaktivator wurde, wie kürzlich beschrieben, hergestellt[2]. Der Wärmeversuch wurde so lange fortgesetzt, bis das in der ersten Periode gebildete Hexosephosphat möglichst vollständig wieder aufgespalten war. Es seien nur zwei Versuche angeführt zum Beweise, daß wenigstens der Größenordnung nach die Wärme mit der beim Glykogen übereinstimmt. Da die

Tabelle VII.

Spaltungswärme der Glucose.

A. Wärmemessung.

Nr.	Datum	Gesamtflüssigkeit ccm	Unverdünnt. Extrakt ccm	Glucosezusatz mg	Phosphatzusatz	Bicarbonatkonzentration %	Zeit	Temperaturanstieg beobachtet °C	Temperaturanstieg korrigiert °C	p_H vorher	p_H nachher	Kalorien gebildet
1	31. I.	84	72	120	0,5 ccm 1,5 m	0.4	3h 40′	0,246	0,267	7,44	6,50	24,8
2	2. II.	79,5	67,5	120			3 35	0,295	0,283	7,68	7,25	25,0

[1] *O. Meyerhof* und *K. Lohmann*, diese Zeitschr. **171**, 421, 1926.
[2] *O. Meyerhof*, ebendaselbst **183**, 176, 1927.

B. Chemische Bestimmung und Berechnung.

Nr.	P_2O_5 vorher mg	P_2O_5 nachher mg	Zucker verestert mg	Milchsäure vorher mg	Milchsäure nachher mg	Milchsäurezunahme mg	Kalorien für Veresterung	Kalorien pro g Milchsäure
1	69,8	62,5	9,5	36,4	140,5	104,1	(0,15)	239
2	71,2	67,1	5,2	34,8	144,0	109,2	—	229

p_H-Verschiebung dieselbe wie beim Glykogen ist und die Hydrolyse des Glykogens in Wegfall kommt, so hätte das Resultat 30 bis 35 cal niedriger liegen müssen.

7. *Die Spaltungswärme der Kreatinsäure („Phosphagen").*

Während über die chemische und physiologische Seite des Phosphagenzerfalls demnächst in einer Arbeit von *O. Meyerhof* und *K. Lohmann* berichtet werden soll, seien hier die in das Gebiet der vorliegenden Arbeit fallenden Wärmemessungen bei der enzymatischen Spaltung des Phosphagens mitgeteilt.

Da das Phosphagen in ganz frischem Extrakt 50 bis 70 % des gesamten präformierten Phosphats ausmachen kann, aber nach 20 Minuten bei 18 bis 20° auf über die Hälfte des Anfangswertes zerfallen ist und in der folgenden Stunde der Rest so gut wie völlig zerfällt, so lag von vornherein der Verdacht nahe, daß der in kohlehydratfreiem Extrakt während der Vorperiode gemessene Temperaturanstieg, wenn er auch nicht genau zu bestimmen war, auf den Zerfall des Phosphagens zu beziehen sei. Anfangs versuchten wir, die Spaltungswärme des präformierten Phosphagens direkt zu messen, und zwar bei 15°, wo der Zerfall verlangsamt ist. Doch ergaben diese Versuche ungenaue Resultate, und nicht viel besser fielen die Versuche aus, bei denen wir auf Grund einer Beobachtung von *O. Meyerhof* und *K. Lohmann* das Phosphagen zunächst bei p_H 9 stabilisierten und dann nach Temperaturausgleich durch Zugabe von Säure und Verschiebung der Reaktion auf p_H 6,9 zum Zerfall brachten.

Eine genauere Messung der Zerfallswärme gelang erst mittels der von Dr. *K. Lohmann* hergestellten Präparate von Kreatinphosphorsäure aus Kaninchenmuskulatur. Die Bariumsalze dieser Präparate enthalten, bezogen auf Phosphorsäure, 80 bis 92 % Phosphagen; der Rest ist fast ausschließlich Hexosemonophosphorsäure. Von anorganischem Phosphat sind sie frei.

Die zusätzliche Phosphatabspaltung und Milchsäurebildung aus dem in den Präparaten enthaltenen Hexosemonophosphat läßt sich im Wärmeversuch leicht feststellen und hierfür eine Korrektur anbringen. Da im allgemeinen nur etwa 0,5 g derart reinen Bariumsalzes des Phosphagens aus einem Kaninchen in etwa achttägiger präparativer Arbeit gewonnen werden können — maximal bis zu 2 g — so standen nur etwa je 0,2 g für den einzelnen Wärmeversuch zur Verfügung, die nach Umsatz mit Natriumsulfat verwandt wurden.

Eine genügend exakte Wärmemessung ist jedoch hier leicht möglich, da auch in ganz kohlehydratfreiem Kaliumchloridextrakt nach einer Vorperiode von 80 bis 90 Minuten zugesetztes Phosphagen im Verlaufe von 2 bis 3 Stunden vollständig gespalten wird. Zur Kontrolle wurde stets ein zweites, wassergefülltes Kalorimeter verwandt, an dem der Beginn des stationären Temperaturganges für die jeweilige Zimmertemperatur bestimmt werden konnte. Weitere Kontrollversuche mit Kaliumchloridextrakt zeigten, daß unter den Versuchsbedingungen ohne Phosphagenzusatz nahezu keine Wärme auftritt (Versuch 4 und 5).

In der folgenden Tabelle VIII sind die Versuche wiedergegeben. Unter der Bezeichnung ,,Gesamtphosphat" wird anorganisches Phosphat + Phosphagen verstanden (direkte *Fiske*-Methode), unter ,,anorganischem Phosphat" das nach *Mathison* bestimmte. Beide Werte stimmen in der Regel vor und nach dem Versuch hier genau überein, vor dem Versuch, weil das präformierte Phosphagen aufgespalten ist, nach dem Versuch, weil das zugesetzte Phosphagen vollständig gespalten ist. (Nur in Versuch 3 ist diese Spaltung unvollkommen.)

Tabelle VIII.

Spaltung der Kreatinphosphorsäure (,,Phosphagen"). (4 und 5 Kontrollmessungen.)

A. Wärmemessung.

Nr.	Datum	Gesamtflüssigkeit ccm	Zusatz entsprechend Bariumsalz mg	Zeit	Temperaturanstieg beobachtet °C	Temperaturanstieg korrigiert °C	p_H vorher	p_H nachher	Kalorien gebildet
1	31. V.	80	150	3h	0,055	0,064	7,27	7,27	5,7
2	11. VI.	71	185	3h 5'	0,062	0,068	7,16	7,16	5,4
3	23. VI.	78	etwa 200	3 40'	0,057	0,060	7,19	7,19	5,22
4	15. VI.	77	—	3h	0,003	0,0045	—	—	0,40
5	4. X.	79	230	4h30'	0,015	0,021	7,04	7,03	1,9

B. Chemische Bestimmung und Berechnung.

Nr.	Gesamtphosphat in mg P_2O_5		Anorganisches Phosphat in mg P_2O_5		Phosphatspaltung in mg H_3PO_4	Milchsäure vorher mg	Milchsäure nachher mg	Kalorien für Milchsäure	Kalorien für Phosphagenspaltung	Kalorien pro g abgespaltene Phosphorsäure
	vor Zusatz	am Schluß	vor Zusatz	am Schluß						
1	49,5	69,5	49,9	71,4	29,0	12,2	17,2	1,05	4,65	**160**
2	37,9	59,9	38,9	60,7	30,2	9,7	14,2	0,95	4,45	**147**
3	47,2	80,2*	47,2	75,0	31,0	20,7	17,7	0	5,22	**168**
4	—	—	—	—	0	12,8	14,8	0,42	0	—
5	49,0	75	49,0	49,0	0	7,5	12,4	1,0	0,9	—

* Hiervon 5,3 mg P_2O_5 in zugesetzter Phosphagenlösung enthalten.

Nr. 4 und 5 der Tabelle VIII stellen zwei Kontrollmessungen mit Froschmuskelextrakt ohne Phosphagenzusatz dar. In Versuch 4 ist Wasser statt Phosphagenlösung zugegeben. Die ganz minimale Wärmebildung innerhalb 3 Stunden ist durch eine entsprechende Milchsäurebildung gedeckt. In Versuch 5 ist Kreatinphosphorsäure zugesetzt, aber wegen einer zu langen (dreistündigen) Vorperiode ganz ungespalten geblieben. Die gemessene Wärme in 4½ Stunden ist nur etwas über die Hälfte durch Milchsäurebildung gedeckt. Der Überschuß (0,9 cal) entspricht der Ungenauigkeit der Wärmemessungen in der Versuchsanordnung. Um diesen Betrag, der 15 bis 20 % der in den Hauptversuchen gemessenen Wärme ausmacht, ist demnach die Spaltungswärme unsicher, d. h. ± 30 cal. Wir nehmen als Durchschnittszahl 150 cal für die Spaltung der Kreatinphosphorsäure pro g H_3PO_4 an.

Über die mit dieser Wärmebildung zusammenhängenden Fragen wird in einer weiteren Arbeit aus unseren Laboratorium demnächst berichtet werden. Es sei nur hingewiesen auf die Bedeutung, die dieser Wärme für den im lebenden Muskel bestimmten kalorischen Quotienten der Milchsäure zukommt. Bei 0,2 % anaerober Milchsäurebildung zerfällt pro Gramm Muskel eine Kreatinphosphorsäuremenge entsprechend etwa 1,5 mg H_3PO_4, auf 1 g Milchsäure kommen also ungefähr 0,75 mg zerfallende H_3PO_4, mit einer Wärmebildung von 110 bis 120 cal.

Wir danken Herrn *Walter Schulz* für seine Mithilfe bei den Versuchen.

Zusammenfassung.

Die im fermenthaltigen Muskelextrakt gemessenen Wärmetönungen für die chemischen Reaktionsphasen, die im Laufe der Muskelkontraktion auftreten, sind die folgenden:

Pro 1 g Zucker beträgt die Wärme der Hydrolyse des Glykogens zu reduzierendem Zucker 12 bis 14 cal, die Veresterungswärme des Glykogens mit Phosphat 10 bis 30 cal; ein Betrag, der durch die Aziditätszunahme und Entionisierung des im Muskel enthaltenen Eiweiß gedeckt wird; die Umwandlung der Hexosemonophosphorsäure in Hexosediphosphorsäure etwa 30 cal, ebenfalls ganz oder nahezu durch die Aziditätszunahme erklärbar; die Spaltungswärme des Hexosediphosphats in Milchsäure und Phosphat etwa 220 cal, abzüglich 25 cal für die Zunahme der Azidität, die Spaltungswärme des Glykogens, in der größten Serie von Versuchen bestimmt, durchschnittlich 204 cal, abzüglich 25 bis 30 cal für die Aziditätszunahme, mithin die Spaltungswärme für sich 176 cal, endlich die Spaltung der Kreatinphosphorsäure in Kreatin und Phosphorsäure 150 bis 160 cal pro Gramm Phosphorsäure (ohne gleichzeitige Verschiebung des p_H).

Untersuchungen über den Stoffwechsel des Nerven.

III. Mitteilung:

Chemismus und Intermediärprozesse[1].

Von

R. W. Gerard[2] und **O. Meyerhof.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 14. Oktober 1927.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

Einleitung.

Neue Versuche des einen von uns über die Wärmeproduktion des peripheren Nerven aus dem physiologischen Institut des University College, London (Nr. I dieser Serie) und über die Atmung des Nerven unter gleichen Bedingungen aus dem hiesigen Institut (Nr. II) haben es wahrscheinlich gemacht, daß der Leitungsvorgang begleitet ist und abhängig von Oxydationsvorgängen als Energiequelle. Dieser Befund steht in scheinbarem Widerspruch mit den älteren Angaben einer stundenlangen Erhaltung der Erregbarkeit des in sauerstofffreier Atmosphäre gehaltenen Nerven. Doch sind diese Beobachtungen, wie schon in den vorhergehenden Arbeiten gezeigt wurde, unzutreffend. Wird nämlich der Sauerstoff strikt ausgeschlossen, so sinkt die Erregbarkeit, gemessen an der Größe der negativen Schwankung sowie der Wärmebildung bereits in 2 Stunden auf einen kleinen Wert[3]. Der Sauerstoffverbrauch sowohl in der Ruhe wie in der Reizung ergab sich in der Arbeit II völlig übereinstimmend mit der an gleichem Material

---

[1] *R. W. Gerard*, Journ. of Physiol. **63**, 280, 1927 (I. Mitteilung); Amer. Journ. of Physiol. **82**, 381, 1927 (II. Mitteilung); *R. W. Gerard* und *O. Meyerhof*, Naturwissensch. **15**, Heft 26, S. 538, 1927 (vorl. Mitteilung); s. auch *Downing, Gerard, Hill*, Proc. Roy. Soc. **100**, 223, 1926; *Gerard*, Journ. Physiol. **62**, 349, 1927.

[2] National Research Fellow U. S. A.

[3] Nr. I der Serie.

unter genau gleichen Versuchsbedingungen gefundenen Wärmebildung, und zwar in der Ruhe (Ischiadicus des Frosches bei 15° in sauerstoffhaltiger Ringerlösung) zu 16 cmm pro Gramm Feuchtgewicht und Stunde im Durchschnitt von 60 Experimenten, während aus der Wärmebildung 14 bis 15 cmm Sauerstoff berechnet wurde; bei Reizung mit 280 maximalen Induktionsschlägen pro Sekunde ergab sich für kurze Reizzeiten ein Extrasauerstoffverbrauch von 61 cmm Sauerstoff pro Gramm und Stunde bei Schwankungen von 48 bis 91 cmm Sauerstoff in 20 Versuchen; dagegen berechnet aus der Wärmebildung 48 cmm Sauerstoff. Bei kontinuierlich fortgesetzter Reizung sinkt dieser Extrasauerstoff auf 18 cmm O_2 pro Gramm und Stunde. Auf Einzelheiten dieser Versuche soll nicht noch einmal eingegangen werden, ebensowenig auf die bereits bestehende Literatur zu diesem Gegenstand, die in den vorhergehenden Arbeiten besprochen ist[1]. Die Variationen in den von den verschiedenen Autoren erhaltenen Zahlen dürften teilweise in unzureichenden Methoden begründet sein, zum anderen aber in der Verschiedenheit des Materials, Vorbehandlung, Temperatur, Reizfrequenz usw., worüber die gemachten Angaben häufig unvollständig sind.

In der vorliegenden Arbeit haben wir es uns zur Aufgabe gemacht, die Intermediärprozesse und die chemische Seite der Oxydationsvorgänge weiter aufzuhellen, sowohl für den Ruhe- wie den Reizstoffwechsel. Diese Ergebnisse stehen gleichzeitig in engen Beziehungen zu den Oxydations- und Spaltungsvorgängen im Muskel und anderen Organen, wie sie im hiesigen Institut studiert worden sind. Der Stoffumsatz im peripheren Nerven ist bisher nur in einer Arbeit von *Hirschberg* und *Winterstein*[2] untersucht im Anschluß an die Arbeiten der Autoren am Froschrückenmark. Sie finden einen bei Reizung etwa verdoppelten Verbrauch verschiedener Zucker aus der Ringerlösung, eine gesteigerte Abgabe stickstoffhaltiger Substanzen in die Lösung, einen ähnlich gesteigerten „Fettumsatz" und Ammoniakproduktion. Die Reizung in ihren Versuchen geschah für die ganze Versuchszeit (etwa 8 Stunden) mit 144 kurzen tetanischen Reihen von Induktionsschlägen pro Minute[3]. Ihre Resultate, auf Oxydation bezogen, sind mit den in dieser Serie mitgeteilten Werten für die Wärmeproduktion und den Sauerstoffverbrauch des gereizten Ischiadicus nicht zu vereinigen. Der gesamte Extrasauerstoff würde sogar bei ununterbrochener 24stündiger Reizung

[1] Vgl. dazu ferner *Winterstein* und *Hirschberg*, Tab. Biol. III, S. 546, 1926; sowie Pflügers Arch. 216, 271, 1927.

[2] Zeitschr. f. physiol. Chem. 108, 27, 1919.

[3] Nach einer privaten Auskunft von Prof. *Winterstein*; in der Arbeit selbst fehlen nähere Angaben darüber.

mit 280 Reizen pro Sekunde und Gramm Nerv nur 0,58 mg Zucker entsprechen, gegenüber einem von den Autoren in ihrer Anordnung gemessenen Mehrverbrauch von 2 bis 3 mg Zucker nebst Umsatz von Fett und Protein. Auch wurde der Ruhesauerstoffverbrauch in unsern Versuchen erst verdoppelt bei hoher Reizfrequenz (über 100 pro Sekunde). Möglicherweise handelt es sich bei den von *Hirschberg* und *Winterstein* beobachteten Veränderungen des Zuckergehaltes der Ringerlösung um eine gesteigerte Absorption des Zuckers im Nerven in Zusammenhang mit erhöhter Permeabilität[1].

Dagegen stimmen die in der Arbeit von *Tashiro*[2] sowie *Winterstein* und *Hirschberg*[3] gemessenen Ammoniakabgaben bei Ruhe und Reizung wenigstens in der Größenordnung mit der von uns gefundenen Ammoniakbildung des Nerven überein.

Methoden.

Alle Versuche, außer über den Temperaturkoeffizienten, wurden im Thermostaten von 15° vorgenommen. Die Präparation der Ischiadici geschah wie in der vorhergehenden Arbeit. Die Nervenzweige wurden kurz am Stamm abgeschnitten, der abgetrennte Nerv ausschließlich mit Glasnadeln berührt.

Die Atmungsmessung geschah, wie ebenfalls schon genauer beschrieben, manometrisch nach dem Verfahren von *O. Warburg* zum Teil mit Differentialmanometern, zum Teil mit einfachen Manometern. Für die Reizversuche diente vorwiegend das erstere, wobei zwei Atmungsgefäße von genau gleichem Gasraum benutzt wurden von der beistehenden Form (Abb. 1) mit eingeschmolzenen Elektroden. Von den Elektroden dienten zwei (*a*) zur Reizung, die beiden anderen (*b*), deren Platindrähte versilbert und dann mit einer Chloridschicht bedeckt waren, um sie unpolarisierbar zu machen, zur Ableitung der negativen Schwankung. Dafür wurde das Ende der Nerven, das auf einen der beiden Drähte zu liegen kam, durch Zerquetschung getötet. Gemessen wurde mit einem *Siemens* Drehspul-Galvanometer. Die Messung des Aktionsstromes besonders in den Anaerobioseversuchen diente zu der Feststellung, ob der Nerv noch erregbar war. Einzelheiten der Anordnung sind in der vorhergehenden Arbeit beschrieben. In der Regel wurden beide Gefäße mit den symmetrischen Nerven beschickt und während einer gewissen Periode die eine Seite gereizt, nach längerer Pause zur Kontrolle nachher die andere Seite. Im allgemeinen wurden die Nerven angefeuchtet, aber ohne weiteren Zusatz von Ringerlösung in die Gefäße gelegt, meist drei bis vier Stück jederseits. Für Atmungsmessungen wurde der Gasraum mit Sauerstoff gefüllt; im Einsatz befand sich 0,1 ccm n Natronlauge.

Die *Milchsäure* wurde in einer Reihe von Versuchen chemisch bestimmt in der in dem Institut üblichen Weise nach dem Verfahren von *Fürth-Charnas* und *Clausen*. Die Mengen, die hierbei zu titrieren waren, lagen im

---

[1] S. z. B. *Verzár*, Pflügers Arch. **211**, 244, 1926.

[2] Amer. Journ. of Physiol. **60**, 519, 1922.

[3] Diese Zeitschr. **156**, 138, 1925.

allgemeinen zwischen 0,1 und 0,3 mg Milchsäure. Titriert wurde mit n/200 Jod aus einer Mikrobürette; die Destillation geschah unter Zusatz von m/1000 Permanganat. Kontrollen mit Zinklactat ergaben für die in Frage kommenden Mengen mit den gegenwärtigen Verbesserungen der Methodik Ausbeuten von 95 bis 100%, im allgemeinen 98%; die Destillationsdauer

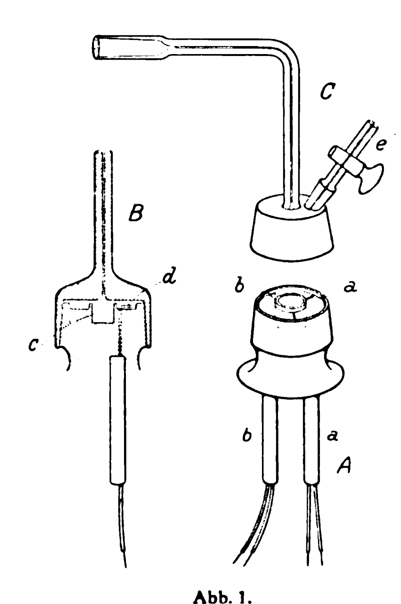


Abb. 1.
Atmungsgefäß für Nervenreizversuche.
A Unterer Gefäßteil. *B* Unterer Gefäßteil im Querschnitt.
C Gefäßhelm, der mit Einheitsschliff an das Manometer gesetzt wird.
Zwei genau gleiche Gefäße befinden sich an den beiden Enden des Differentialmanometers.
a Reizelektroden.
b Elektroden zur Ableitung der negativen Schwankung.
c Einsatz, der für Messung des Sauerstoffverbrauchs mit 0,1 ccm n NaOH gefüllt wird, bei Messung der anaeroben Milchsäurebildung leer bleibt.
d Ringförmige Rinne, auf der drei bis vier Nerven nebeneinander liegen.
e Kapillarhahn zum Wechseln der Gasfüllung (N_2 oder O_2), während das Gefäß sich im Thermostaten befindet.
Der gesamte Gasraum des Gefäßes inklusive Manometerschenkel beträgt 1,5 ccm.

betrug etwa 20 bis 25 Minuten[1]. Für Reizversuche in Stickstoff dienten Gefäße der beistehenden Form, die in den Thermostaten gehängt werden konnten (Abb. 2). Der Stickstoff wurde nach dem Verfahren von *Kautsky* und *Thiele*[2] mittels Durchpressen durch Porzellanzellen und Durchleiten des Schaumes durch eine 1 m hohe Säule von Natriumhydrosulfitlösung vollständig von Sauerstoffspuren befreit.

---

[1] Diese Zahlen sind nicht sehr verschieden von den mit der vervollkommneten Anordnung des *Clausen*schen Verfahrens von *Friedemann*, *Cotonio* und *Shaffer* (Journ. Biol. Chemistry **78**, 335, 1927) erhaltenen.

[2] *Kautsky* und *Thiele*, Zeitschr. f. anorg. u. allgem. Chem. **152**, 342, 1926.

Für jede Einzelbestimmung mußten 8 bis 16 größere Nerven benutzt werden, im Gesamtgewicht von 200 bis 500 mg. Kombinierte Versuche, in denen der Verlauf der Milchsäurebildung über längere Zeiträume verfolgt werden sollte, erforderten 40 bis 50 Frösche. Da dies Verfahren zu umständlich war, wurde in der Mehrzahl der Versuche die Milchsäure ebenfalls manometrisch nach dem Verfahren von *O. Warburg*[1] in bicarbonathaltiger Ringerlösung durch Austreiben von CO_2 bestimmt, nachdem der Vergleich der manometrischen und chemischen Messungen eine gute Übereinstimmung ergeben hatte. In diesem Falle diente nach der *Warburg*schen Vorschrift Stickstoff mit 5% Kohlensäure, der durch Überleiten über glühendes Kupfer gereinigt war. Als Gefäße wurden meist dieselben wie für die Atmungsmessung verwandt oder die kürzlich für die enzymatische Milchsäurebildung im Muskelextrakt angegebenen[2], von denen wir auch einige mit auf dem Boden eingeschmolzenen Platindrähten besaßen. Diese Gefäße mit sackförmigem Anhang dienten insbesondere zur Bestimmung

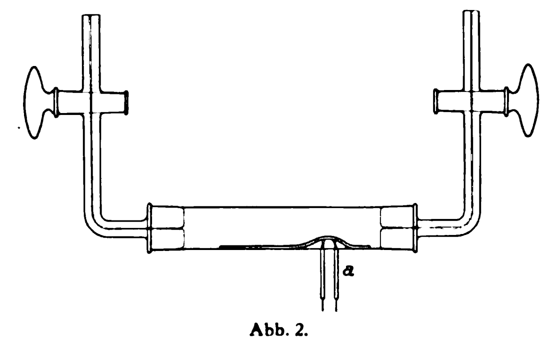


Abb. 2.
Gefäß für Reizversuche in Stickstoff mit chemischer Milchsäurebestimmung.
Die Nerven werden über die Elektroden *a* gelegt. Das ganze Gefäß hängt im Thermostaten.

des Gesamtgehaltes an Bicarbonat zu Beginn und Schluß des Versuchs[3], das durch Einkippen von Salzsäure gemessen wurde. Dies Verfahren dient zur Trennung der fixen Säure (Milchsäure) von anaerob produzierter Kohlensäure. Da jedoch der Betrag der letzteren im Vergleich zur Milchsäure außerordentlich gering ist[4], wurde in der Regel hierauf verzichtet und nach dem ersteren Verfahren gearbeitet. Die gesamte, in den Gasraum abgegebene Kohlensäure wurde dann auf Milchsäurebildung bezogen. Die Messung der Milchsäurebildung bei der Reizung geschah ebenfalls teilweise mit Differentialmanometer. Dann wurden ebenso wie bei der Atmungsmessung die symmetrischen Nerven in die beiden Seiten verteilt und die eine Seite gereizt. Der Ausschlag ergab dann den Überschuß der Milchsäurebildung bei der Reizung (s. unten S. 139).

Die Bestimmung des *Kohlehydrats* wurde nach dem von *O. Meyerhof* und *K. Lohmann* beschriebenen Verfahren vorgenommen[5], wobei die niederen

---

[1] Diese Zeitschr. **142**, 317, 1923.
[2] *O. Meyerhof*, ebendaselbst **178**, 395, 1926.
[3] *Negelein* (unter *Warburg*), ebendaselbst **158**, 121, 1925.
[4] S. Nr. II dieser Serie.
[5] Diese Zeitschr. **171**, 385, 1926.

Kohlenhydrate und das Glykogen getrennt bestimmt werden nach Entfernung der N-haltigen Extraktivstoffe mittels Quecksilberacetat in schwach alkalischer Lösung. Entsprechend den Erfahrungen von *Winterstein* und *Hirschberg*[1] sowie *Holmes* und *Holmes*[2] am Zentralnervensystem wurden die Cerebroside aus der Glykogenfraktion entfernt, und zwar nach dem Vorschlag der letzteren Autoren mit heißem Alkohol und heißem Chloroform.

Die Abgabe von *Ammoniak* von seiten des Froschnerven an das umgebende Medium (Gasraum, Ringerlösung) ist bereits von *Tashiro* sowie *Winterstein* und *Hirschberg* in den oben angeführten Arbeiten untersucht. In unseren Versuchen bestimmten wir nicht diese Abgabe, sondern die Differenz des Ammoniakgehalts des Nerven (und umgebenden Mediums) zu Beginn und Schluß des Versuchs. Bei bloßer Bestimmung der Ammoniakabgabe könnte z. B. die bei der Reizung gefundene Zunahme auf eine erhöhte Permeabilität zurückgeführt werden. Andererseits besteht bei dem von uns gebrauchten Verfahren die Schwierigkeit, daß der Ammoniakgehalt des Nerven ziemlich inkonstant ist und daß nicht in jedem Versuch die symmetrischen Nerven, deren Gehalt verhältnismäßig gut übereinstimmt, zur Bestimmung des Anfangswertes benutzt werden können. Als Anfangsgehalt wurde deshalb eine Mittelzahl genommen. Die Methode der Extraktion und Bestimmung war die von *Folin*, wobei in der Behandlung des Materials nach der früher benutzten Vorschrift[3] verfahren wurde. Zur Neßlerisierung verwandten wir das neue *Dubosq*sche Kolorimeter von *Leitz* für 100 mm Schichthöhe (mit Tageslichtfilter).

I. Die Ruhemilchsäurebildung des Nerven.

A. Chemische Bestimmungen.

In 6 Versuchen, die als Kontrolle für andere dienten, wurde der Anfangsgehalt der Milchsäure in frischen Nerven bestimmt, die bei 0° präpariert waren. Die Werte sind in Tabelle I wiedergegeben.

Tabelle I.

Anfangsgehalt der Milchsäure in frisch entnommenen Nerven.

Nr.	Datum	Froschart E: Esculenten T. Temporarien	Zahl der Nerven	Gewicht mg	Milchsäure gefunden mg	Milchsäure %	Bemerkungen
1a	5. III.	E	10	222	0,24	0,11	Symmetrische Nerven derselben Frösche
1b	5. III.	E	10	233	0,24	0,10	
2	10. III.	E	15	304	0,38	0,12	
3	14. III.	E	15	289	0,45	0,16	
4a	19. IV.	T	8	160	0,11	0,07	Symmetrische Nerven derselben Frösche
4b	19. IV.	T	8	179	0,14	0,08	
					Durchschnitt:	0,107	

[1] Ebendaselbst **159**, 351, 1925; s. auch *Takahashi*, ebendaselbst **154**, 444, 1924.

[2] Biochemical Journ. **20**, 1197, 1926.

[3] *O. Meyerhof, K. Lohmann, R. Meier*, Diese Zeitschr. **157**, 459, 1925.



Der Durchschnitt beträgt 0,11 %. Da die Bestimmungen an symmetrischen Nerven eine gute Übereinstimmung ergeben, müssen die Variationen zwischen den Versuchen auf individuelle Differenzen bezogen werden, die die Fehlergrenze der Methode deutlich überschreiten.

In 6 ähnlichen Versuchen wurde der durchschnittliche Milchsäuregehalt nach ungefähr 20stündigem Aufenthalt der Nerven in sauerstoffgesättigter Ringerlösung oder in feuchtem Sauerstoff bestimmt (vgl. Tabelle II). Er betrug hier 0,10 %, also ebensoviel wie in frisch entnommenen Nerven.

Tabelle II.

Milchsäuregehalt des Nerven nach 20stündigem Aufenthalt in Sauerstoff.

Nr.	Datum	Froschart E: Esculenten T: Temporarien	Zahl der Nerven	Gewicht mg	Milchsäure gefunden mg	Milchsäure %
1	27. bis 30. I.	E	16	544	0,33	0,06
2	1. bis 5. II.	E	19	549	0,41	0,07
3	6. II.	E	14	549	0,31	0,06
4	10. bis 20. II.	E und T	12	462	0,51	0,11
5	13. III.	E	13	300	0,42	0,14
6	14. III.	E	15	287	0,36	0,13
					Durchschnitt:	0,095

In einem weiteren Versuch wurden zwei Reihen Nerven 17 Stunden in Stickstoff gehalten, in der einen Probe die Milchsäure direkt bestimmt, in der zweiten nach einem weiteren 4stündigen Aufenthalt in Sauerstoff. Die beiden Werte stimmten überein, so daß ein nachträgliches Verschwinden von Milchsäure nicht festgestellt werden konnte.

Tabelle IIa.

Einfluß von Sauerstoff auf die in Stickstoff gebildete Milchsäure.

Nr.	Datum	Froschart E: Esculenten T: Temporarien	Zahl der Nerven	Gewicht mg	Milchsäure gefunden mg	Milchsäure %	Bemerkungen
1	19. IV.	T	8	210	0,24	0,11	17 Std. in Stickstoff
2	19. IV.	T	8	157	0,21	0,14	
3	19. IV.	T	8	181	0,24	0,13	17 Std. in Stickstoff, darauf 4 Std. in Sauerstoff

Die Ruheanaerobiose in Stickstoff wurde in einer Reihe weiterer Versuche teils chemisch, teils manometrisch gemessen. Bei den chemischen Bestimmungen, die jedoch als weniger genau anzusehen sind, ergab sich bereits eine deutliche Milchsäurebildung, und zwar in 6 Versuchen von 20stündiger Dauer eine durchschnittliche Zunahme von 60 mg-% oder 3 mg-% pro Stunde. Der genauere Gang der Milch-

Tabelle III.

Milchsäuregehalt nach 20 Stunden in Stickstoff.

Nr.	Datum	Froschart E: Esculenten T: Temporarien	Zahl der Nerven	Gewicht mg	Milchsäure gefunden mg	Milchsäure %
1	6. II.	E	14	504	0,48	0,10
2	21. II.	T	10	292	0,48	0,16
3	22. II.	T	10	342	0,73	0,21
4	13. III.	E	15	318	0,82	0,26
5	19. IV.	T	8	210	0,24	0,11
6	19. IV.	T	8	157	0,21	0,14
					Durchschnitt:	0,163 %
					Anstieg:	0,056 %

Tabelle IV.

Milchsäuregehalt nach 2 Stunden in Stickstoff.

Nr.	Datum	Froschart E: Esculenten T: Temporarien	Zahl der Nerven	Gewicht mg	Milchsäure gefunden mg	Milchsäure %
1	21. II.	T	10	283	0,43	0,15
2	19. IV.	T	8	183	0,19	0,10
3	19. IV.	T	8	207	0,19	0,09
4	4. V.	T	12	344	0,43	0,13
5	9. V.	T	10	306	0,34	0,11
6	30. V.	E	8	365	0,49	0,14
					Durchschnitt:	0,120 %
					Anstieg:	0,013 %

Tabelle V.

Milchsäuregehalt nach 4 Stunden in Stickstoff.

Nr.	Datum	Froschart E: Esculenten T: Temporarien	Zahl der Nerven	Gewicht mg	Milchsäure gefunden mg	Milchsäure %
1	19. IV.	T	8	200	0,23	0,11
2	19. IV.	T	8	190	0,32	0,17
3	4. V.	T	12	334	0,46	0,14
4	9. V.	T	10	297	0,44	0,15
5	30. V.	E	8	343	0,49	0,15
					Durchschnitt:	0,145 %
					Anstieg:	0,038 %

säurebildung ließ sich erst in den manometrischen Versuchen feststellen. In den Tabellen III bis V sind die chemisch bestimmten Endwerte der Milchsäure nach 20, 2 und 4 Stunden angegeben, unter Berechnung der Zunahme gegenüber dem Durchschnittswert des Anfangsgehalts. Es war in diesen Versuchen nicht möglich, stets für die symmetrischen Nerven den Anfangsgehalt zu bestimmen und auch die Genauigkeit für die Auswertung jedes einzelnen Versuchs nicht groß genug.

Der vollständigste Versuch, bei dem gleichzeitig die manometrische und chemische Messung miteinander verglichen wurde, ist in Abb. 3 wiedergegeben. 42 Frösche von demselben Fang wurden benutzt; davon wurden 4 Nerven zur manometrischen Bestimmung für die ganze Zeit verwandt; die anderen wurden in 5 Portionen geteilt und die

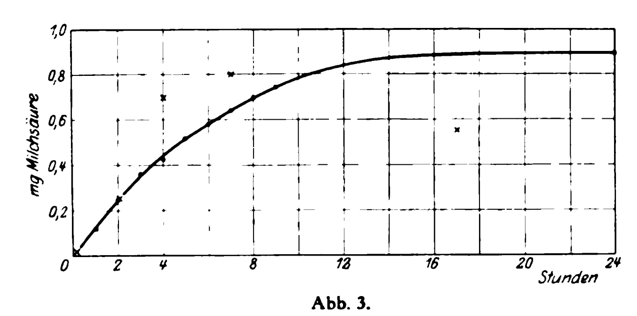


Abb. 3.
Anaerobe Milchsäurebildung des Nerven.
Vergleich chemischer und manometrischer Milchsäurebestimmung.
Ordinate: mg Milchsäure pro g. × Chemische Bestimmungen.
Abszisse: Zeit in Stunden. ●——● Manometrische Bestimmungen.

symmetrischen Nerven wieder getrennt. So wurden 10 Gruppen erhalten, von denen die erste sofort getötet wurde, die dazu gehörigen Nerven nach 2 Stunden in Stickstoff. Von der Portion 2 wurden a) nach 2 Stunden, b) nach 4 Stunden in Stickstoff getötet, Portion 3 a) nach 4 Stunden, b) nach 7 Stunden, Portion 4 a) nach 7 Stunden, b) nach 17 Stunden, Portion 5 a) nach 17 Stunden, b) sofort. Auf diese Weise war eine möglichst vollständige Deckung der ganzen Zeitkurve der Milchsäurebildung in den verschiedenen Portionen erreicht. Die chemischen Resultate sind mit Kreuzen in der Abbildung wiedergegeben, wobei die Ruhewerte abgezogen sind. Die Streuung ist groß, aber durchschnittlich deckt sich das Ergebnis der manometrischen und chemischen Versuche.

B. Manometrische Bestimmungen.

Tabelle VI gibt die Resultate von 30 Experimenten, in denen die Milchsäurebildung in Stickstoff manometrisch gemessen ist.

Tabelle VI.

Verlauf der Milchsäurebildung manometrisch gemessen.

Nr.	Datum	Froschart	Ringerlösung ccm	Zahl der Nerven	Gewicht mg	Milchsäure in 20 Std. gebildet mg-%	Von Gesamtmilchsäure in 4 Std. gebildet %	Bildungsgeschwindigkeit pro Stunde in mg-%		Bemerkungen
								Durchschnitt	Maximum	
1	31. I.	E	—	2	70	38	—	—	—	
2	5. IV.	E	—	4	75	82	—	—	—	
3	19. IV.	T	0,4	4	110	88	50	4,4	12	
4	25. IV.	T	0,6	3	60	100	40	5,1	11	Symmetrische Nerven (4, 4a)
4a	25. IV.	T	0,2	3	60	96	42	4,8	10	
4b			0,1	3	60	60	45	3,0	8	Ebenso (4b, 4c)
4c			0,1	3	60	65	37	3,2	?	
5	29. IV.	E	0,02	2	45	40	42	2,0	5	
6	2. V.	E	0,1	2	50	—	—	—	—	
6a			0,6	2	50	79	20	3,9	4	
7	6. V.	T	0,5	3	80	38	58	1,9	9	„ (7, 7a)
7a			0,5	3	80	41	58	2,0	13	
8	16. V.	E	0,5	2	65	74	40	3,7	11	
9	18. V.	T	0,6	2	70	122	30	6,1	11	
10	26. V.	E	0,5	2	85	35	45	1,8	6	
11	31. V.	E	0,5	2	70	35	34	1,8	4	„ (11, 11a)
11a			0,1	2	70	41	37	2,0	5	
11b			0,5	2	70	45	34	2,2	6	„ (11b, 11c)
11c			0,1	2	70	44	40	2,2	7	
12	1. VI.	E	0,5	2	110	74	42	3,7	12	„ (12, 12a)
12a			0,5	2	110	89	46	4,5	14	
13	2. VI.	E	0,05	2	100	59	42	3,0	8	
13a			0,5	2	100	76	26	3,8	6	
14	8. VI.	E	0,5	2	120	43	34	2,1	4	
14a			0,5	2	120	39	33	2,0	4	„ (14a, 14b)
14b			0,2	2	120	40	28	2,0	5	
15	10. VI.	E	0,5	2	90	48	33	2,4	4	
16	10. VI.	E	0,5	2	110	67	—	3,4	—	
16a			0,5	2	110	124	—	6,2	—	
17	17. VI.	E	0,5	2	75	69	36	3,5	7	
18	22. VI.	E	0,5	2	80	60	29	3,0	6	

In Abb. 4 sind der durchschnittliche Verlauf und die extremen Kurven dargestellt. Es ergibt sich daraus, daß in der ersten Stunde sehr wenig Milchsäure gebildet wird, dann eine maximale Geschwindigkeit erreicht wird, welche allmählich wieder abfällt. Die durchschnittliche Anfangsgeschwindigkeit, abgesehen von der Anfangslücke, ist 7,4 mg-% pro Stunde, die durchschnittliche Geschwindigkeit für 20 Stunden 3 mg-%, und in 4 Stunden sind etwa 37% der Gesamtmilchsäure gebildet. Die Zahlen stimmen etwa mit den chemisch erhaltenen überein.

Während die symmetrischen Nerven auf etwa 10% übereinstimmen, sind die Variationen in den verschiedenen Experimenten ziemlich groß sowohl bezüglich der Gesamtmilchsäure wie des Abfalls der Geschwindig-

keit. Die Variationen hängen ab von der Jahreszeit, der Temperatur und den Ernährungsbedingungen der Frösche und sind in der Tat, wie sich in folgendem ergibt, durch den Kohlehydratvorrat des Nerven hervorgerufen.

Daß der Abfall der Geschwindigkeit nicht durch Anhäufung von Milchsäure bedingt ist, läßt sich auf verschiedenem Wege zeigen.

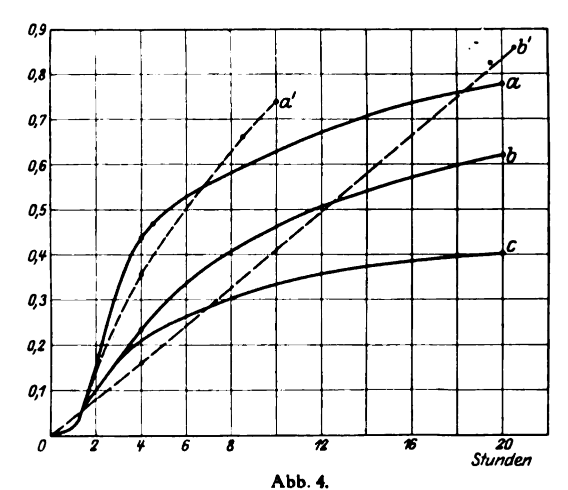


Abb. 4.
Übersicht über den Verlauf der Milchsäurebildung während der Ruheanaerobiose im Nerven.
——— Verlauf in reiner Ringerlösung.
– – – Verlauf in glucosehaltiger Ringerlösung.
a, *b* und *c* stellen die maximale, minimale und durchschnittliche Milchsäurebildung in sämtlichen Versuchen in reiner Ringerlösung dar, ebenso *a'* und *b'* maximale und minimale Geschwindigkeit in zuckerhaltiger Ringerlösung.

In 4 Versuchen wurde 0,1 % Milchsäure in bicarbonathaltige Ringerlösung zugegeben und die Bildungsgeschwindigkeit mit der in reiner Bicarbonat-Ringerlösung verglichen. Es ergab sich kein Unterschied (s. Tabelle VII).

Daß die Milchsäure in die Nerven ein- und ausdiffundieren kann, ergibt sich schon daraus, daß sie in die Ringerlösung übertritt und Bicarbonat darin austreibt. Auch läßt sie sich hier chemisch mit der *Hopkins*schen Thiophenprobe nachweisen. Es folgt somit, daß auch die von außen zugesetzte Milchsäure in den Nerven hineindiffundieren kann und trotzdem keine hemmende Wirkung auf die weitere Milchsäurebildung besitzt. Man kann auch noch auf andere Weise feststellen, daß ihre Anhäufung ohne Einfluß auf die weitere Milchsäurebildung ist. Hält man die Nerven anaerob in einer geringen Flüssigkeitsmenge (0,05 bis 0,1 ccm), so müßte der hemmende Einfluß der Milchsäure rascher eintreten als in einem größeren Volumen (0,6 ccm). Dies ist jedoch nicht der Fall, so daß die Wirkung ausgeschiedener

Tabelle VII.

Nr.	Datum	Froschart	Zahl der Nerven	Gewicht mg	Milchsäure nach 20 Std. mg-%	Von Gesamtmilchsäure in 4 Std. gebildet %	Bildungsgeschwindigkeit pro Stunde in mg-%		Bemerkungen
							Durchschnitt	Maximum	
1	25. IV.	T	3	60	60	45	3,0	8	Reine Ringerlösung
1a			3	60	87	25	4,4	7	Milchsäurezusatz
2	29. IV.	E	2	45	86	25	4,3	5	Reine Ringerlösung
2a			2	45	82	27	4,1	6	Milchsäurezusatz
3	2. VI.	E	2	100	76	26	3,8	6	Reine Ringerlösung
3a			2	100	78	21	3,9	6	Milchsäurezusatz
3b			2	100	66	30	3,3	6	Milchsäurezusatz

Stoffwechselprodukte nicht in Frage kommt. Umgekehrt ergeben die Versuche mit Glucosezusatz, in denen die Gesamtmilchsäurebildung drei- bis viermal so groß ist, daß die Geschwindigkeit trotz der viel stärkeren Anhäufung der Säure nicht abfällt.

In der Tat ist das Fehlen der Kohlehydrate die wesentliche Ursache des Geschwindigkeitsabfalls. Denn Zusatz von 0,1 % Glucose zur Ringerlösung führt zu einer Milchsäurebildung, die für mindestens 30 Stunden vollständig konstant ist. Die Resultate von 15 derartigen Versuchen sind in der Tabelle VIII wiedergegeben und auf Abb. 4, 5 und 6 abgebildet. Die durchschnittliche Anfangsgeschwindigkeit ist 12,5 mg-% pro Stunde, ungefähr 65% mehr als ohne Glucose.

Wenn die Nerven in 0,5 ccm Glucose-Ringerlösung suspendiert sind, bleibt die Geschwindigkeit für über 30 Stunden konstant. Wenn dagegen die Nerven von etwa 70 mg Gesamtgewicht in 0,05 ccm Glucose-Ringerlösung gehalten werden, so fällt die Milchsäurebildungsgeschwindigkeit in ungefähr 15 Stunden progressiv ab. Wenn die Nerven, die vorher in Glucose-Ringerlösung gelegen haben, sich mit dieser ins Gleichgewicht gesetzt haben, so sollen 0,05 ccm Zucker-Ringerlösung + 0,07 g Nerven 0,12 mg Glucose enthalten, abgesehen von höherem Kohlehydrat im Nerven. Bei einer Geschwindigkeit von 12,5 mg-% pro Stunde müßten diese 0,12 mg in etwa 15 Stunden aufgezehrt sein.

Die Glucose als Quelle der Milchsäurebildung läßt sich weder durch Galaktose noch durch Fructose ersetzen. Der Nerv stimmt hier also mit dem Verhalten der grauen Hirnsubstanz überein, wie es *Loebel* aus diesem Institut gezeigt hat[1]. Die gesamte Menge Milchsäure, die ein

[1] Diese Zeitschr. **161**, 219, 1925.

Tabelle VIII.

Milchsäurebildung in Gegenwart von Glucose.

Nr.	Datum	Froschart	Zahl der Nerven	Gewicht mg	Milchsäure in 20 Std. gebildet %	Von Gesamtmilchsäure in 4 Std. gebildet %	Geschwindigkeit der Milchsäurebildung in mg-% pro Std. Durchschnitt	Maximum	Ringerlösung (0,1 % Glucose) ccm	Bemerkungen
1	31. I.	E	2	70	0,112	—	5,6	—	0,5	*
2	23. II.	T	3	70	0,28	—	14,0	—	0,5	
2a			3	70	0,20	—	10,0	—	0,5	
3	29. III.	E	3	80	0,22	—	11,0	—	0,5	
4	5. IV.	E	4	75	0,18	—	9,0	—	0,6	*
5	25. IV.	T	3	60	0,37	20	18,0	18	0,6	*
6	29. IV.	E	2	45	0,20	25	10,0	14	0,1	*
6a			2	45	0,17	35	8,7	15	0,1	
7	2. V.	E	2	50	0,24	20	12,0	12	0,6	*
8	16. V.	E	2	65	0,17	20	8,7	9	0,5	*
8a			2	65	0,13	30	6,4	10	0,05	
8b			2	65	0,12	36	6,2	12	0,05	
9	18. V.	T	2	70	0,16	18	7,9	8	0,6	*
9a			2	70	0,11	30	5,4	10	0,05	
9b			2	70	0,12	35	5,7	11	0,05	
10	9. VI.	E	3	160	0,07	40	3,5	9	0,05	
11	10. VI.	E	2	90	0,15	21	7,3	8	0,5	*
				Durchschnitt:		—	—	12,5		
	Für 0,5 ccm Ringerlösung + Glucose:					21	12	13		
	„ 0,05 „ „ + „ :					33	7	12		

* Die symmetrischen Nerven sind in Tabelle VII in den unter gleichem Datum angegebenen Versuchen mit reiner Ringerlösung benutzt.

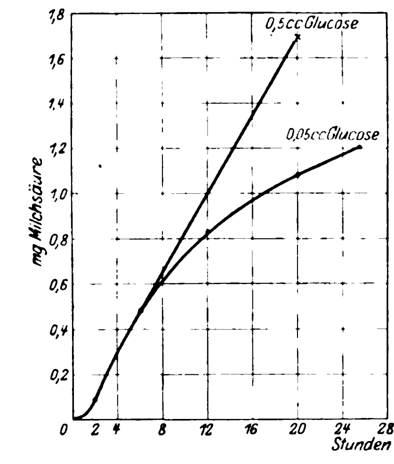


Abb. 5.

Milchsäurebildung in 70 mg Nerven mit 0,5 ccm und 0,05 ccm 0,1 %iger Glucose-Ringerlösung. Die Geschwindigkeit fällt im letzteren Falle ab, wenn die Glucose der Ringerlösung plus dem im Nerven präformierten Kohlehydrat verbraucht ist.

Nerv in Stickstoff ohne Zuckerzusatz bildet, beträgt etwa 0,1 %, so daß eine ähnliche Menge Glucose-bildendes Kohlehydrat vorhanden sein muß. Hierauf werden wir unten zurückkommen[1].

Tabelle IX.

Vergleich der verschiedenen Kohlehydrate.

17. Juni. Esculenten. In jedem Gefäß 2 Nerven von je 75 mg.

Benutzter Zucker	Milchsäure in 20 Stunden %	Gesamtumsatz, nach 4 Stunden gebildet %	Geschwindigkeit der Milchsäurebildung in mg-% pro Stunde		Ringerlösung ccm
			Durchschnitt von 20 Stunden	Maximum	
—	0,07	36	3,5	7	0,6
Fructose . . .	0,06	41	2,8	9	0,6
„ . . .	0,06	43	3,0	7	0,6
Galaktose . . .	0,07	43	3,5	12	0,6
Glucose . . .	0,22	35	11,0	23	0,6

Daß der Abfall der Geschwindigkeit durch Verbrauch von Kohlehydrat bedingt ist, ergibt sich weiter durch den Verlauf bei 15 und 28° (Abb. 6). Die Anfangsgeschwindigkeit bei 28° ist mehr als verdreifacht,

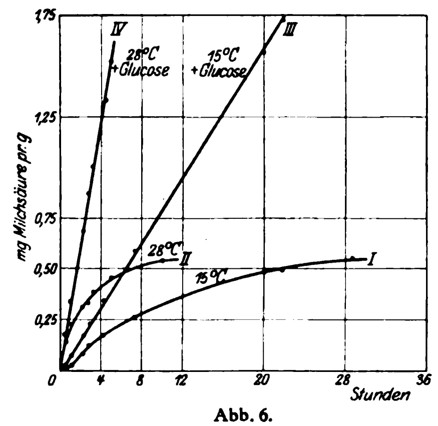


Abb. 6.

Verlauf der anaeroben Milchsäurebildung in reiner Ringerlösung (I und II) und Glucose-Ringerlösung (III und IV) bei 15 und 28°.
Während im ersteren Falle dasselbe „Milchsäuremaximum" erreicht wird entsprechend dem Gehalt des Nerven an Kohlehydrat, steigt bei Zusatz von Glucose die Milchsäurebildung ohne Abfall der Geschwindigkeit dauernd an.

[1] In einigen Versuchen wurde beobachtet, daß, wenn die Geschwindigkeit in Stickstoff auf einen kleinen Bruchteil abgefallen war und eine Periode in Sauerstoff eingeschaltet wurde, in einer zweiten Anaerobioseperiode die Milchsäurebildungsgeschwindigkeit anfangs wieder etwas erhöht war, ohne daß die Gesamtausbeute stieg. Es ist demnach noch ein zweiter Faktor außer der Konzentration des Kohlehydrats für die Umsatzgröße verantwortlich, vielleicht die Hydrolysegeschwindigkeit der höheren Kohlehydrate.



aber der Abfall geschieht um so rascher, so daß die Gesamtausbeute an Milchsäure genau ebenso groß ist wie bei 15°, was wiederum die Erschöpfung des Kohlehydratvorrats anzeigt. In Anwesenheit von Glucose wird die höhere Geschwindigkeit dauernd aufrecht erhalten, ebenso wie bei tieferer Temperatur. Der Q_{10} für 15 bis 25° ist 2 bis 3.

Tabelle X.

Temperaturkoeffizient in Glucose-Ringerlösung (0,5 ccm 0,1% Glucose).

Nr.	Datum	Froschart	Zahl der Nerven	Gewicht mg	Anfangsgeschwindigkeit in mg-% Milchsäure pro Std.	Temperatur	Q_{10}
1	1. VI.	E	2	100	26	+ 28°	2*
1a					25	+ 28	
2	10. VI.	E	2	90	30	+ 28	3
2a					8	+ 15	

* Mit Durchschnittswert von 15° verglichen.

II. Die Abwesenheit von Extramilchsäure bei der Reizung in Stickstoff.

Von besonderer Wichtigkeit ist die Frage, ob die Tätigkeit des Nerven einen Einfluß auf die anaerobe Milchsäurebildung ausübt.

Die Bestimmung dieses Einflusses ist ziemlich schwierig, weil ein kontinuierlich gereizter Nerv unter streng anaeroben Bedingungen in seiner Erregbarkeit sofort nachläßt und im Verlaufe von 2 bis 3 Stunden völlig unerregbar wird. Andererseits aber wird eine konstante Milchsäurebildung erst nach Ablauf von etwa 1 Stunde in Stickstoff merklich. 3 Methoden wurden verwandt: Die Messung mit dem Differentialmanometer, dessen eine Seite mit den ruhenden Nerven beschickt war, die andere mit den zu reizenden, beide in Stickstoff. 2. Messung mit einfachem Manometer, Gefäß mit Elektroden versehen, mit alternierenden Reiz- und Ruheperioden gebraucht oder im Vergleich mit einem anderen Gefäß mit ruhenden Nerven. 3. Die chemische Bestimmung der Milchsäure, nachdem die Nerven in den Reizgefäßen Abb. 2 gelegen hatten. Die ungereizten lagen dann im gleichen Gefäß außerhalb der Elektroden. 5 derartige Versuche mit chemischer Bestimmung der Milchsäure und Reizung von 2 bis 4 Stunden sind in der Tabelle XI aufgeführt. Es ergibt sich keine Steigerung über den Ruheumsatz.

In 8 Versuchen wurde der Effekt der Reizung mit einfachen Manometern untersucht, wobei einmal die Reizung dauernd für 2 bis 3 Stunden geschah und die Kontrollnerven in einem anderen Gefäß lagen. Die durchschnittliche Ruhe-Milchsäurebildung in dieser Zeit betrug hier 10 mg-%, die der gereizten Nerven 11,3 mg-%, also durchschnittlich 13% mehr. (Der Überschuß in vier einzelnen Experimenten war 2,0,

Tabelle XI.

Vergleich der anaeroben Milchsäurebildung bei Ruhe und Reizung.

Nr.	Datum	Froschart	Zahl der Nerven	Gewicht mg	Milchsäure gefunden mg	Milchsäure %	Aufenthalt in Stickstoff Stunden	Behandlung der Nerven
1	4. V.	T	12	334	0,46	0,14	4	Ruhe
1a				330	0,47	0,14		Reizung
2	9. V.	T	10	306	0,34	0,11	2	Ruhe
2a				313	0,41	0,13		Reizung
3	9. V.	T	10	297	0,44	0,15	4	Ruhe
3a				299	0,41	0,14		Reizung
4	30. V.	E	8	365	0,49	0,14	3	Ruhe
4a				359	0,42	0,12		Reizung
5	30. V.	E	8	343	0,49	0,15	5*	Ruhe
5a				353	0,55	0,16		Reizung
				Durchschnitt	Ruhe:	0,138		
					Reizung:	0,138		

* Glucose-Ringerlösung.

1,2, 1,9 und 0 mg-%). In 4 anderen Experimenten wurden die Nerven in größeren Intervallen gereizt und die Milchsäurebildung während der Reizperiode und Ruheperiode verglichen. Hier ergab sich in 4 solchen Versuchen 0,7 mg-% weniger in der Reizperiode (in 4 Experimenten dreimal — 1 mg-%, einmal 0). Alle diese Unterschiede liegen innerhalb der Fehlergrenze. Schließlich wurden 4 Versuche mit dem Differentialmanometer ausgeführt und ergaben einen Überschuß der Milchsäure auf der gereizten Seite von 1,6 mg-% pro Stunde Reizung, und zwar in den einzelnen Versuchen: + 2,8 mg-%, + 4,0 mg-%, — 1,5 mg-%, + 1,2 mg-%. Übrigens wird die geringe Mehrproduktion an Milchsäure auch dann noch erhalten, wenn die Erregbarkeit beinahe erloschen ist. In jedem Falle ergibt sich aus den chemischen wie manometrischen Messungen, daß durch den Erregungsvorgang in Stickstoff die Milchsäurebildung entweder überhaupt nicht oder nur ganz unbeträchtlich erhöht wird, nicht über die Fehlergrenzen der Methode, während ja in Sauerstoff die Atmungsgröße bei der Reizung mehr als verdoppelt ist. Der Leitungsvorgang kann daher mit keiner Anhäufung von Milchsäure verknüpft sein.

III. Andere Stoffwechselvorgänge.

A. Das weitere Schicksal der Milchsäure.

Wie früher mitgeteilt[1], steigert Milchsäurezusatz die Atmung nicht, und ebenso findet man keine deutliche Abnahme einmal gebildeter

[1] *R. W. Gerard,* Amer. Journ. Physiol. **82**, 381, 1927.

Milchsäure bei nachträglicher Überführung der Nerven in Sauerstoff. Auch konnte in einem Sauerstoff-Kohlensäuregemisch unter diesen Umständen keine Retention von Kohlensäure beobachtet werden, wie sie dem Verbrauch von Lactat entsprochen hätte. Ob ein solcher Milchsäureverbrauch in der ersten Stunde nach Überführung der Nerven in Sauerstoff stattfindet, ist bei den kleinen Umsätzen nicht entscheidbar. Leichter ist es, den Verbrauch zugesetzten Lactats zu studieren. Legt man einen Froschmuskel in lactathaltige Ringerlösung ein, so verschwindet, wie früher festgestellt wurde[1], Milchsäure in mehrfachem Betrage derjenigen, die oxydiert werden kann, durch Resynthese zu Kohlehydrat. Beim Nerven ist dieses jedoch nicht der Fall. Hierzu wurden Nerven in (n/100) Lactat-Bicarbonat-Ringerlösung mit einer Atmosphäre von $O_2 + 5\% \, CO_2$ ins Gleichgewicht gebracht und in der einen Portion Nerven zu Beginn des Versuchs, in den symmetrischen Nerven nach 20stündigem Aufenthalt in der Lösung der Gesamtgehalt an Bicarbonat mittels Übersäuerung durch HCl bestimmt[2]. Es ergab sich in 2 Versuchen eine Bicarbonatzunahme von 5,0 cmm CO_2 pro 97 mg Nerven in 20 Stunden 20 Minuten und 5,2 cmm CO_2 pro 117 mg Nerven in 19 Stunden 15 Minuten. Da 1 cmm CO_2 0,004 mg Milchsäure entsprechen, die durch 3 cmm O_2 oxydiert werden, ist der Milchsäureverbrauch einem Aufwand von 7,5 bzw. 6,9 cmm O_2 pro Gramm und Stunde äquivalent, während die Atmungsgröße 16 bis 17 cmm O_2 pro Gramm und Stunde beträgt. Es wird also noch nicht die Hälfte der Atmung durch Milchsäureoxydation bestritten und darüber hinaus findet keine Synthese von Milchsäure zu Kohlehydrat statt. Wir schließen daraus, daß auch die vom Nerven gebildete Milchsäure nur zu einem geringen Teil oxydiert und nicht zu Kohlehydrat synthetisiert werden kann.

B. Kohlehydratumsatz.

Zum Vergleich der Größe der Milchsäurebildung mit dem Kohlehydratgehalt wurde in einer Reihe von Fällen das Glykogen und die niederen Kohlehydrate im frischen Nerven bestimmt. Es erwies sich bei den kleinen Mengen als aussichtslos, direkt die Abnahme des Kohlehydrats mit der Milchsäurebildung zu vergleichen. Dagegen sind eine Reihe von Bestimmungen nach mehr oder minder langem Aufenthalt der Nerven in Sauerstoff bzw. Stickstoff gemacht und ergaben einen durchschnittlichen Gehalt von 0,1 %, wie er etwa der Gesamtmilchsäurebildung in zuckerfreier Ringerlösung unter anaeroben Bedingungen entspricht.

---

[1] *O. Meyerhof, K. Lohmann, R. Meier,* ebendaselbst **157**, 449 1925.

[2] *Negelein,* ebendaselbst **158**, 121, 1925; *O. Meyerhof* und *K. Lohmann* ebendaselbst **171**, 381, 1926.

Tabelle XII.
Kohlehydrat des peripheren Nerven.

Nr.	Datum	Froschart	Zahl der Nerven	Gewicht mg	Glykogen %	Niedere Kohlehydrate %	Gesamtkohlehydrate %	Vorbehandlung der Nerven
1	27. bis 30. I.	E	16	542	0,04	—	—	20 Std. in O_2
2	1. bis 5. II.	E	17	549	0,02	0,05	0,07	20 Std. in O_2
3	10. bis 20. II.	E + T	16	530	0,03	0,06	0,09	20 Std. in O_2
4*	22. II.	E	12	280	0,05	0,18	0,23	1 Std. in O_2
				285	0,06	0,14	0,20	17 „ „ „
5	10. VI.	E	20	970	0,025	0,03	0,055	Sofort
				1040	0,045	0,01	0,055	20 Std. in N_2

* In diesem Versuch sind die N-haltigen Extraktivstoffe nicht entfernt.

C. Ammoniak.

Zum Schluß teilen wir die Versuche über die Ammoniakbildung des Nerven mit, die wir nur als vorläufig betrachten, da die Ursache der großen Variation des Ammoniakgehalts der frischen Nerven nicht aufgeklärt werden konnte. Der Anfangsgehalt des Nerven schwankte zwischen 0,8 und 5 mg-%[1]. Der Durchschnitt betrug 2,4 mg-%. Bei bis 20stündigem Aufenthalt in Sauerstoff war der Ammoniakgehalt meist, aber nicht regelmäßig, erhöht (Zunahme durchschnittlich 0,2 mg-% pro Stunde), noch etwas mehr in Stickstoff (0,3 mg-% pro Stunde). Dagegen fand sich eine sichere Erhöhung der Ammoniakbildung bei der Reizung. In 5 Versuchen ergaben Nerven, die während 4 bis 6 Stunden in Sauerstoff gereizt waren, eine Zunahme an Ammoniak, die 2,5 bis 3 mal so groß war wie die der ungereizten Kontrollnerven, wobei die Extrabildung 0,45 mg-% pro Stunde betrug, und zwar in den einzelnen Versuchen: 0,76, 0,39, 0,30, 0,28, 0,52. Diese Zunahme ist ungefähr dieselbe wie die von *Winterstein* und *Hirschberg* beobachtete gesteigerte Abgabe von Ammoniak an die Ringerlösung während der Reizung[2]. Wieweit dieser Prozeß für den Leitungsvorgang wichtig ist, muß vorläufig dahingestellt bleiben und soll weiterhin untersucht werden.

IV. Zusammenfassende Betrachtung der verschiedenen Stoffwechselvorgänge.

A. Der Chemismus des Ruhestoffwechsels.

Der Sauerstoffverbrauch im ruhenden Frosch-Ischiadicus von 15° ergab sich im Durchschnitt zu 16 bis 20 cmm O_2 pro Gramm und Stunde

[1] Vielleicht stehen diese Schwankungen im Zusammenhang mit der traumatischen Ammoniakbildung, die kürzlich von *Parnas* und *Mozolowsky* (diese Zeitschr. **184**, 399, 1927) studiert worden ist.

[2] Diese Zeitschr. **156**, 138, 1925. Die Autoren fanden bei 18,5 bis 20° eine Extraproduktion Ammoniak pro Stunde von etwa 0,6 mg-% bei der Reizung.

(= 0,025 mg), ein Wert, der genau übereinstimmt mit der Atmungsgröße des intakten ruhenden Froschmuskels von gleicher Temperatur. Die Milchsäurebildung in der Ruheanaerobiose beträgt in der Anfangszeit durchschnittlich 0,074 mg pro Gramm und Stunde, ebenfalls mit der Milchsäurebildung des ruhenden Froschmuskels übereinstimmend. Da in Sauerstoff keine Milchsäure auftritt, unterdrückt also 0,025 mg Sauerstoff die Bildung von 0,074 mg Milchsäure, was einen Oxydationsquotienten der Milchsäure von 3 ergibt. Da jedoch hier die Bildung nicht mit maximaler Geschwindigkeit geschieht, haben wir noch nicht den wahren Wert des Oxydationsquotienten. Vielmehr wird in Glucoselösung die anaerobe Milchsäurebildung auf 0,125 mg pro Gramm und Stunde gesteigert, während die Atmungsgröße in Glucoselösung nicht steigt. Auch unter diesen Umständen kommt es in Sauerstoff zu keinerlei Anhäufung von Milchsäure. Der Oxydationsquotient ist dann 4,5, also genau so groß wie unter den günstigsten Umständen in der Muskulatur. Während dieser Zusammenhang so wie im Muskel gedeutet werden kann durch einen Kreislauf der Milchsäure, bei dem sie in „statu nascendi“ oder ein Intermediärprodukt unter Aufwand von Oxydationsenergie wieder zurückverwandelt wird, kann im Gegensatz zum Muskel einmal entstandene Milchsäure nicht mehr in Kohlehydrat verwandelt werden. Eine solche Rückverwandlung ließ sich ebensowenig in der grauen Hirnsubstanz nachweisen[1], die also auch hier mit dem peripheren Nerven übereinstimmt. Auffällig dagegen ist, daß im Unterschied von dieser Lactat und Glucose die Ruheatmung nicht steigern und kaum oxydiert werden. Tatsächlich ändert sich in ihrer Gegenwart auch nicht der respiratorische Quotient, der ebenso wie in reiner Ringerlösung 0,8 bleibt. Als Beispiel sei ein Doppelversuch angeführt mit und ohne Glucose: Versuchszeit 19,5 Stunden, je 2 Nerven pro Gefäß. a) ohne Glucose: 83 cmm Sauerstoff, 66 cmm CO_2, respiratorischer Quotient 0,8, Sauerstoffverbrauch pro Gramm und Stunde 15 cmm; b) mit Glucose: 0,113 mg Nerven, 93 cmm O_2, 65 cmm CO_2, respiratorischer Quotient 0,8, Sauerstoffverbrauch 15 cmm pro Gramm und Stunde.

Wir haben hier also einen sicheren Fall, wo die Oxydation von zur Hauptasche Nichtkohlehydrat die Milchsäurebildung verhindert bzw. rückgängig macht.

Die Milchsäurebildung eines in Stickstoff befindlichen Nerven beginnt nicht sofort mit maximaler Geschwindigkeit, vielmehr entsteht in der ersten Stunde eine kaum nachweisbare Menge. Dies kann nicht auf dem Fortbestehen von Atmung auf Grund *gelösten* Sauerstoffs beruhen, da dieser, wie sich berechnen läßt, in 5 bis 10 Minuten aus

[1] *Takane*, diese Zeitschr. **171**, 403, 1926.



dem Nerven herausdiffundiert oder verbraucht sein muß. Wahrscheinlich enthält der Nerv einen gewissen Vorrat *gebundenen* Sauerstoffs, der in der Atmung verbraucht werden kann, wofür auch das Entstehen von etwas Kohlensäure spricht, die in der Anaerobiose beobachtet wird. In gleicher Richtung deutet, daß bei 28° das Zeitintervall bis zum Beginn der stationären Milchsäurebildung sehr viel kürzer ist entsprechend dem rascheren Verbrauch dieses Reserve-Sauerstoffs.

Schließlich sei erwähnt, daß im Nerven wie in anderen Geweben die Milchsäurebildung aus Glucose auch durch Hemmung der Oxydation mittels HCN in normaler Weise veranlaßt wird. Die anaerobe Milchsäurebildung wird noch durch $4 \cdot 10^{-2}$ n KCN nicht gehemmt (stündliche Milchsäurebildung pro Gramm Frischgewicht bei 15° 0,085 mg in 0,1 %iger Glucose-Ringerlösung, während 20 Stunden). Andererseits hemmt $2 \cdot 10^{-2}$ bis $1 \cdot 10^{-3}$ n KCN die Atmung um 80 bis 90 %. Unter Benutzung der *Warburg*schen Kästchenmethode wurden je 6 zusammengehörige Nerven von 277 und 274 mg in 3 und 8 ccm KCN-haltige Ringer-(0,1 %)-Glucose-(0,26 %)-Bicarbonatlösung suspendiert (n/500 KCN).

Es ergab sich:

	Nach 6 Stunden	Nach 21 Stunden
x_{O_2}	4,05 cmm	12,4 cmm
x_{CO_2}	44,4 „	111,0 „

Daraus pro 1 g und 1 Stunde:

	6-Stunden-Wert	21-Stunden-Wert
$\mathfrak{Q}_{O_2}$	2,5 cmm	2,2 cmm
$\mathfrak{Q}_{CO_2}$ (extra)	24,7 „	17,1 „
Milchsäure	0,099 mg	0,069 mg

Bei einer Atmungshemmung von 85 % ist also die Höhe der anaeroben Milchsäurebildung ungefähr erreicht.

B. Der Chemismus des Reizstoffwechsels.

Es wurde in einer vorhergehenden Arbeit gezeigt[1], daß die Wärmeproduktion bei dem Erregungsprozeß in zwei Phasen zerfällt, ähnlich wie im Muskel, die aber durch Anaerobiose nicht gesondert werden können, weiterhin, daß die ganze Wärme durch Oxydation hervorgerufen wird. Bezüglich derjenigen Reaktionen, die jeder einzelnen Phase entsprechen, wissen wir nichts Bestimmtes.

[1] *R. W. Gerard*, Journ. of physiol. **63**, 280, 1927.

Daß auch in der Anaerobiose die Milchsäurebildung nicht für den Leitungsvorgang verantwortlich ist, ergibt sich daraus, daß die Leitfähigkeit des Nerven auf 0 abgefallen ist in einer Zeit, wo die Milchsäurebildung ihr Maximum erreicht hat, d. h. nach etwa 3 Stunden, ferner, daß der Zusatz von Glucose die Milchsäurebildung für 2 Tage unterhält in einer Geschwindigkeit, die das 1½fache der normalen beträgt, aber die Erregbarkeit trotzdem in Glucoselösung ungefähr so schnell abfällt wie ohne Zucker, gemessen an der Stärke des Aktionsstromes. Man muß daher annehmen, daß der Ruhe- und Reizstoffwechsel des Nerven verschieden sind und der erstere vielleicht zum Teil auf andere Gewebselemente zu beziehen ist.

Zweifellos muß die relativ große Ammoniakbildung bei der Reizung in Betracht gezogen werden. Tatsächlich könnte eine Ammoniakbildung von 0,3 bis 0,4 mg-% pro Stunde einem Umsatz von 2 mg-% Protein entsprechen. Die Oxydation dieser Menge ergäbe 0,08 cal pro Gramm und Stunde, etwa ebensoviel, wie bei kontinuierlicher Reizung vom Nerven gebildet wird. Der respiratorische Quotient während der Erregung stünde hiermit nicht in Widerspruch, da er bei der Oxydation von Eiweiß ohne Harnstoffbildung = 0,95 sein würde. Andererseits beweist aber die Ammoniakbildung noch keine Oxydation von Eiweiß, da ja auch anaerob Ammoniak gebildet wird. Ob also Kohlehydrat oder Eiweiß bei dem Erregungsstoffwechsel oxydiert wird, kann bisher nicht entschieden werden.

Zusammenfassung.

In der vorliegenden Arbeit wird der Stoffwechsel des peripheren Nerven bei Ruhe und Reizung mit chemischen Methoden studiert im Anschluß an die vorangegangenen Arbeiten über den Gaswechsel und Wärmebildung.

1. Während isolierte ruhende Nerven in Sauerstoff keine Milchsäure bilden, geschieht dies in Stickstoff. Die stündliche Milchsäurebildung nimmt zunächst bis zur zweiten Stunde zu und von der vierten Stunde an stark ab. Die Geschwindigkeit der Maximalperiode beträgt etwa 7,4 mg-% pro Stunde, die Gesamtausbeute in 20 Stunden 50 bis 100 mg-%. (20° C). Der Abfall ist durch Kohlehydratmangel bedingt. Bei Suspension des Nerven in traubenzuckerhaltiger Ringerlösung bleibt die Geschwindigkeit in Höhe von 12,5 mg-% pro Stunde für mehr als 30 Stunden konstant. Das bedeutet eine 60 %ige Steigerung über die Maximalgeschwindigkeit ohne Zucker. Anhäufung von Milchsäure selbst hemmt die Glykolyse nicht. Andererseits verschwindet einmal gebildete Milchsäure in Sauerstoff nicht mehr, sie wird nicht resynthetisiert und kaum oxydiert.

2. Durch Reizung in Stickstoff wird die Milchsäurebildung entweder gar nicht oder nur ganz unbeträchtlich erhöht im scharfen Gegensatz zu der starken Steigerung der Atmung bei der Reizung in Sauerstoff.

3. Die Gesamtausbeute an Milchsäure in zuckerfreier Lösung entspricht ungefähr dem Kohlehydratgehalt des Nerven. Neben der Kohlehydratspaltung gibt es eine schon von anderen Autoren beschriebene Ammoniakbildung, die im ruhenden Nerven in Sauerstoff sehr gering ist, in Stickstoff wenig größer, die aber bei der Reizung des Nerven in Sauerstoff stark steigt.

4. Betrachtet man die Vorgänge im Zusammenhang, so ergibt sich, daß im Nerven wie im Muskel der Verbrauch von Atmungssauerstoff in der Ruhe die 3 bis 5fache Menge derjenigen Milchsäure, die oxydiert werden könnte, am Entstehen hindert. Der respiratorische Quotient der Ruheatmung beträgt dabei nur 0,8 und wird durch Zuckerzusatz nicht beeinflußt; diese beruht also nicht auf Kohlehydratoxydation. Andererseits ergab sich bei der Reizung eine Steigerung des respiratorischen Quotienten auf 1. Es bleibt jedoch offen, ob dies auf Kohlehydratoxydation oder im Zusammenhang mit der Ammoniakbildung auf die von Eiweiß zu beziehen ist. Jedenfalls ist der Erregungsvorgang mit einer Oxydation verknüpft, denn die Erregbarkeit in Stickstoff und ebenso die Wärmebildung des Erregungsvorganges sinken zu einer Zeit, wo der anaerobe Stoffwechsel einsetzt, und auch bei Erhöhung des letzteren in Zuckerlösung findet dies Absinken in gleicher Weise statt.

Über Atmung und Gärung in grünen Pflanzen[1].

II. Mitteilung[2]: Der Stoffwechsel der Phanerogamen.

Von

Louis Genevois (Bordeaux).

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(*Eingegangen am 14. Oktober 1927.*)

Mit 1 Abbildung im Text.

In der vorliegenden Arbeit werden die Versuche, die ich über die Atmung und Gärung von grünen Algen angestellt hatte, auf höhere Pflanzen ausgedehnt. Es war gezeigt worden, 1. daß Algenzellen in Zuckerlösung in Abwesenheit von Sauerstoff eine für viele Stunden konstante Gärung zeigen, die aber, auf gleiche Gasvolumia bezogen, erheblich kleiner als die Atmung ist und daher in Luft vollständig verschwindet; 2. daß die Gärung bei Zusatz von Blausäure auch in Gegenwart von Luft in normaler Höhe fortbesteht, obgleich die Atmung bei den meisten Algen durch HCN nicht vollständig gehemmt wird, sondern, wie schon von *Emerson*[3] gezeigt wurde, lediglich die durch Zucker bewirkte Atmungssteigerung dabei verschwindet. Um einen besseren Einblick in die quantitativen Beziehungen von Atmung und Gärung zu gewinnen und auch den Mechanismus der Blausäurewirkung weiter aufzuklären, habe ich auf Vorschlag von Herrn *Meyerhof* die gegenwärtigen Versuche vorwiegend an ein und derselben Pflanzenart vorgenommen und die einzelnen Gewebe derselben in verschiedenen Zuständen von Wachstum und Ernährung auf die Größe der Atmung und Gärung, wie auf ihre Blausäureempfindlichkeit untersucht.

An tierischen Zellen, insbesondere dem Warmblütergewebe, ist bekanntlich von *O. Warburg*[4] gezeigt, daß die Gewebe während des

---

[1] Auch diese Arbeit ist mit Unterstützung des „International Education Board" der Rockefeller-Stiftung ausgeführt, dem ich dafür meinen besten Dank sage.

[2] Vgl. hierzu I. Mitteilung, diese Zeitschr. **186**, 461, 1927.

[3] Journ. General Physiol. **10**, 469 1927.

[4] Stoffwechsel der Tumoren. Berlin, J. Springer, 1926.

Wachstums erheblich stärker glykolysieren als im Ruhezustand. Bei normalem Wachstum tritt diese gesteigerte Glykolyse in Sauerstoff nicht in Erscheinung, da sie durch eine entsprechend große Atmung rückgängig gemacht wird. Beim Übergang vom Wachstum zur Ruhe ist das Absinken des Spaltungsumsatzes viel größer als das Absinken der Atmungsgröße. Ich habe mir die Frage vorgelegt, ob sich eine ähnliche Gesetzmäßigkeit auch bei pflanzlichen Geweben findet. Auf Grund der folgenden Versuche glaube ich, diese Frage bejahen zu können. Allerdings war auch bei den am stärksten wachsenden Pflanzengeweben die Gärung, auf gleiche Gasvolumina O_2 und CO_2 bezogen, höchstens ebenso groß, meist kleiner als die Atmung.

Die Beziehung der Stoffwechselgrößen auf Trockengewicht hat natürlich bei Pflanzen nur dann einen Sinn, wenn die Gewebe holzfrei sind. Auch bei holzfreien Geweben ist aber der Anteil der Zellwände wechselnd und bei älteren Pflanzenteilen mit dickeren Zellwänden ein Herabgehen des Stoffwechsels pro Gewichtseinheit zu erwarten. Außerdem können wir aber unterscheiden, ob ein Gewebe von etwa gleichem Alter sich in der Wachstumsperiode befindet oder im Ruhezustand.

Da auch die Atmung und Gärung der Samen untersucht werden sollte, war eine Pflanze zu wählen, deren Samen möglichst fettfrei ist und wesentlich Kohlehydrate enthält. Andererseits sollten die Pflanzen Blüten besitzen, deren Samenanlage leicht zu trennen war. Von den in Betracht kommenden Pflanzenfamilien, den Renonculaceae und Papilionaceae habe ich eine Art der letzteren gewählt, weil sie rascher wächst, und zwar die Wicke Lathyrus odorata maxima alba. Es wurde eine farblose Varietät benutzt, weil die Anthocyane möglicherweise die Versuche gestört hätten. Daneben wurden einige andere Pflanzen auf Atmungs- und Gärungsgröße ihrer Gewebe verglichen.

Die Samen wurden 20 Stunden in Wasser quellen gelassen und danach zur Keimung längere Zeit auf feuchtem Filtrierpapier gehalten. Die Keimlinge von verschiedenem Alter wurden für die Messung von den Samen abgetrennt. Die Dicke der Keimlinge im Stoffwechselversuch betrug etwa ½ bis 1 mm. Benutzt man die Formel von *O. Warburg* für die Grenzschnittdicke der Gewebe und ihre Modifikation für zylindrische Organe[1]

$$r_0 = 2\sqrt{c_0 \frac{D}{A}}$$

und setzt man den *Krogh*schen Diffusionskoeffizienten D für Pflanzengewebe gleich Wasser ($3{,}4 \cdot 10^{-5}$), die Atmungsgröße A (Kubikzentimeter O_2 pro Kubikzentimeter Gewebe und Minute) gleich dem höchst beobachteten Wert ($4 \cdot 10^{-3}$), c_0, die Sauerstoffkonzentration in Atmo-

[1] *O. Meyerhof* und *W. Schulz*, Pflügers Arch. **217**, 558, 1927.

sphären für Luft gleich 0,2, so ergibt sich der Radius r_0 für die Grenzdicke = 0,41 mm, also 0,8 mm Durchmesser. Dieser Querschnitt wurde bei den stärker atmenden Keimlingen nicht überschritten. Demgemäß wurde zwischen intakten und zerschnittenen Keimlingen kein Unterschied in der Atmungsgröße gefunden. Dickere und ältere Pflanzenorgane, Stengel, Fruchtknoten usw. wurden in Schnitten verwandt. Für die Untersuchung der älteren Gewebe wurde ein Teil der Samen in Töpfe gesät und im Gewächshaus des Instituts untergebracht. Herrn Geheimrat *Correns* sage ich für die Erlaubnis, sein Gewächshaus zu benutzen, meinen besten Dank.

Die Methodik der Atmungs- und Gärungsmessung war die manometrische nach *O. Warburg*, wie in der vorigen Arbeit. Die Versuchstemperatur betrug 20°. Die Atmung wurde in Luft bestimmt, da reiner Sauerstoff vielleicht schädlich gewirkt hätte. Die Gefäße wurden zum Ausschluß der Assimilation mit Stanniol umwickelt. Bei der Bestimmung der Gärungsgröße wurde nur die gesamte Extrakohlensäure bestimmt, mithin zwischen der bei der Gärung gebildeten und der durch fixe Säuren ausgetriebenen Kohlensäure nicht unterschieden. Die Alkoholbildung in allen Fällen beweist jedoch, daß die gemessene Kohlensäure zur Hauptsache echte Gärungskohlensäure war. Das Trockengewicht wurde nach Beendigung des Versuchs nach Trocknung bei 100° bis zur Gewichtskonstanz bestimmt. Die Bezeichnungen entsprechen den von *O. Warburg* eingeführten: Q_{O_2}: Kubikmillimeter Sauerstoffverbrauch in Luft pro Milligramm Trockengewicht und Stunde; $Q^L_{CO_2}$: Kubikmillimeter Extrakohlensäure in Luft pro Milligramm Trockengewicht und Stunde; $Q^{N_2}_{CO_2}$ dasselbe in Stickstoff (mit 5% Kohlensäure).

Kapitel I:
Zusammenhang von Stoffwechselgröße und Alter der Gewebe.

Ein gewisser Zusammenhang zwischen Atmungsgröße und Wachstum war schon in den Versuchen von *Saussure*[1] festgestellt. Andererseits geht bekanntlich die Entdeckung der alkoholischen Gärung der anaerob gehaltenen Pflanzenteile auf *Pasteur* zurück (sogenannte „intramolekulare Atmung"); doch ist die Größe dieser im Zusammenhang mit der Entwicklung der Pflanzen nicht verfolgt worden[2].

[1] Zitiert nach *Kostytschew*, Pflanzenatmung, S. 7.

[2] Die Größe der Atmung und der anaeroben Gärung bei der Quellung und Keimung des Samens von Pisum sativum ist von *D. S. Fernandes* untersucht (Rec. trav. bot. Neerland **20**, 216, 1923; hier auch weitere Literatur). In dieser Arbeit wird ebenfalls ein relatives Absinken der anaeroben Gärung gegenüber der Atmung in den ersten Tagen der Entwicklung festgestellt. Doch sind die Werte nur für den ganzen Samen mit Keimlingen bestimmt, so daß keine Berechnung der absoluten Stoffwechselgrößen möglich ist.

Wir betrachten der Reihe nach:

a) Die Stoffwechselgröße des gequollenen Samens,
b) ,, ,, junger und älterer Keimlinge,
c) ,, ,, der verschiedenen Organe junger grüner Pflanzen,
d) ,, ,, der verschiedenen Blütenteile.

a) Gequollene Samen.

Die alkoholische Gärung der gequollenen Samen ist bekannt. Vergleicht man unter anaeroben Bedingungen die Gärungsgröße intakter und zerschnittener Samen, so findet man fast keinen Unterschied. Anders aber die Atmung. Im intakten Samen ist sie sehr klein und ihr Q-Wert um ein Mehrfaches kleiner als der der Gärung. Beim zerschnittenen Samen steigt sie auf das Dreifache; also reicht wahrscheinlich im intakten Samen die Sauerstoffversorgung zur Erreichung der maximalen Atmung nicht aus. Infolgedessen bleibt im intakten Samen auch in Luft eine bestimmte Gärungsgröße übrig, im zerschnittenen Samen aber nicht. Aus diesem Rückstand der Gärung in Luft kann man ungefähr den Oxydationsquotienten berechnen, unter dem ich mit *O. Meyerhof* verstehe:

$$\frac{\text{verschwundener Gärungsumsatz in Mol. Zucker}}{\text{Atmungsumsatz in Mol. Zucker}}.$$

Er ergibt sich zu 4,8, von derselben Größenordnung wie bei Hefe.

Eine Übersicht über die Versuche gibt Tabelle I. Auch in dieser sind zum besseren Vergleich die Stoffwechselgrößen auf das Trockengewicht bezogen, obgleich diesem hier keine besondere Bedeutung zukommt, da ja die gequollenen Samen größtenteils aus Reservematerial bestehen.

Tabelle I.

Atmung und Gärung gequollener Samen.

I. Versuch 8. Juli: alte Samen, 24 Stunden lang gequollen in Leitungswasser.

II. Versuch 26. September: junge, schon trockene Samen, frisch auf den Pflanzen gepflückt, 4 Stunden lang gequollen.

	Intakte Samen		Zerschnittene Samen	
	I	II	I	II
Q_{O_2}	0,064	0,096	0,185	0,244
$Q^{N_2}_{CO_2}$	0,150	0,192	0,162	0,232
$Q^{L}_{CO_2}$	0,048	0,042	0,0	0,00
$\frac{Q^{N_2}_{CO_2} - Q^{L}_{CO_2}}{Q_{O_2}}$	1,59	1,56		
Oxydationsquotient . .	4,77	4,68		

b) Keimlinge verschiedenen Alters.

Die ganz jungen abgeschnittenen Keimlinge, die völlig aus wachsenden jugendlichen Zellen bestehen, zeigen eine große Atmung und eine relativ große anaerobe Gärung. An den folgenden Tagen sinken beide Größen, wobei aber der Abfall der Gärungsgröße stärker als der der Atmung ist. In Tabelle II ist eine Übersicht über die Q-Werte von 4 bis 26 Tagen gegeben und auf Abb. 1 der Verlauf beider Größen für nicht etiolierte Keimlinge dargestellt. Es ergab sich früher bei den Algen ein Q_{O_2}-Wert von etwa 1 bis 2, der in Zuckerlösung auf etwa 5 stieg, ebenso ein $Q^{N}_{CO_2}$-Wert in Zucker zwischen 1,5 und 3,5. Die Stoffwechselgröße der jungen Keimlinge stimmt also etwa mit der von grünen Algen in Zuckerlösung überein, ein Umstand, auf den in Kapitel II noch eingegangen wird.

Werden die Keimlinge statt frei im Gewächshaus im Dunkeln gezüchtet und vollkommen etioliert, so sind Atmung und Gärung im gleichen Alter geringer (s. Nr. 8 Tabelle II).

Tabelle II.
Atmung und Gärung von Lathyrus-Keimlingen verschiedenen Alters.

Nr.	Datum	Alter Tage	Länge mm	Q_{O_2}	$Q^{N_2}_{CO_2}$
1	28. VI.	4	10—15	4,3	3,0
2	25. VI.	6	10—20	4,2	2,6
3	21. VI.	8	20—40	4,1	1,8
4	15. VI.	10	50—60	3,3	1,7
5	24. VI.	11	40—60	2,9	1,4
6	17. VI.	15	100—150	2,6	0,8
7	30. VI.	26	200—300	1,7	0,7
8 *	28. VI.	21	100—120	1,0	0,5

* Etioliert.

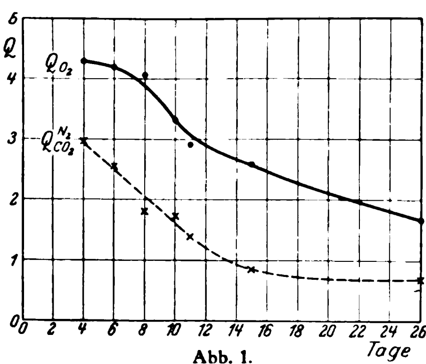


Abb. 1.
Verlauf der Atmung (●——●) und der Gärung (×······×) von Lathyrus-Keimlingen verschiedenen Alters.
Ordinate: Q-Werte ($Q^{N_2}_{CO_2}$ ×: Q_{O_2} ●).
Abszisse: Tage.

c) *Grüne Pflanzen.*

Gleichzeitig mit der morphologischen Differenzierung der Gewebe tritt auch ein Unterschied der Stoffwechselgrößen der verschiedenen Pflanzenorgane auf. Die Atmungsgröße der Sprosse ist nahezu so hoch wie die der jüngsten Keimlinge ($Q_{O_2} = 3,5$), während die von Wurzeln, Stengeln, Blättern nur halb so groß ist. Die Gärung ist dagegen in allen Pflanzen etwa gleich und wenig höher als bei älteren Keimlingen. Diese Versuche wurden sowohl mit *jungen* Lathyrus-Pflanzen von 30 bis 31 Tagen angestellt, als auch mit 3 bis 4 Monate alten. Die Werte für beide Altersstufen sind in Tabelle III zusammengestellt.

Tabelle III.

Atmung und Gärung verschiedener Pflanzenorgane von Lathyrus odorata.

Nr.	Datum	Alter Tage	Organ	Q_{O_2}	$Q_{CO_2}^{N_2}$
1	30. VI.	30	Sprosse	3,5	1,0
2			Blätter	1,7	0,7
3			Wurzel	1,6	1,0
4	1. VI.	31	Blatt	1,4	0,8
5			Stengel (zerschnitten)	1,6	0,8
6	20. IX.	122	Sprosse	3,6	1,0
7			Blatt	1,8	0,6
8	21. IX.	123	Junges Blatt	2,2	0,9
9			Altes Blatt	2,3	0,7
10			Stengel (zerschnitten)	2,0	1,1

Vergleichsweise sind in Tabelle IV dieselben Organe bei einigen anderen Pflanzen untersucht.

Tabelle IV.

Atmung und Gärung der Organe verschiedener Pflanzen.

Datum	Art	Organ	Q_{O_2}	$Q_{CO_2}^{N_2}$
18. V.	Caltha palustris	Blatt	1,0	1,0
		Stengel (zerschnitten)	1,2	0,8
16. V.	Valeriana officinalis	Blatt	1,8	1,1
		Stengel	1,5	1,4
14. V.	Elodea Canadensis	Blatt und Stengel	0,9	0,3
20. V.	Saxifraga Tridactylites	Stengel	1,0	0,3
11. VI.	Ipomaea grandiflora (junge Pflanzen)	Blatt	2,2	0,8
		Stengel	2,5	1,1
		Wurzel	2,4	1,2

Sollte eine starke Gärung das Charakteristikum des embryonalen undifferenzierten Gewebes sein, so war zu erwarten, daß sie sich bei den jungen Samenanlagen wiederfindet. In der Tat war dies der Fall, wie sich im nächsten Abschnitt ergibt.

d) Verschiedene Blütenteile.

Die Stoffwechselgröße verschiedener Teile der Blüten wurde außer bei der Wicke auch noch bei der Akelei und der Sumpfdotterblume gemessen. In allen drei Fällen, besonders deutlich bei Lathyrus und Caltha palustris, ergab sich, daß die verschiedenen Organe der Blüten einen stärkeren Stoffwechsel besitzen als die sonstigen grünen Pflanzenteile. Hierbei steigen Atmung und Gärung in der Reihenfolge: Blumenblätter, Staubblätter, Samenanlagen an. Bei den letzteren ist Atmung und anaerobe Gärung etwa ebenso groß wie bei den jüngsten Keimlingen. Der Stoffwechsel der Samenanlage in der Mutterpflanze ist daher schon ganz ähnlich demjenigen, der nach der Keimung auftritt. Eine Übersicht über die Versuche mit Lathyrus gibt die Tabelle V.

Tabelle V.

Stoffwechsel der Blütenteile von Lathyrus odorata.

Nr.	Datum	Organ	Q_{O_2}	$Q_{CO_2}^{N_2}$
1	19. IX.	Halberwachsenes Blumenblatt	3,3	1,3
2		Erwachsenes „	2,6	0,8
3	22. IX.	Filamente	1,6	0,6
4	22. IX.	Fruchtknoten, ganze	3,0	0,9
5	24. IX.	„ „	2,4	0,7
6	23. IX.	Junge Samenanlagen	3,3	2,0
7	24. IX.	Ganz junge Samenanlagen	**4,2**	**3,7**

Die Versuche mit Aquileja und Caltha palustris sind in der Tabelle VI aufgeführt.

Tabelle VI.

Stoffwechsel der Blütenteile von Caltha palustris und Aquileja vulgaris.

Nr.	Datum	Art	Organ	Q_{O_2}	$Q_{CO_2}^{N_2}$
1	18. V.	Caltha palustris	Blumenblatt	2,1	1,5
2			Staubblatt	3,3	1,6
3	17. V.		Samenanlage	**3,6**	**3,4**
4	26. V.	Aquileja vulgaris	Kelchblatt	1,5	0,6
5			Blumenblatt	2,0	0,6
6			Staubblatt	1,9	0,9
7	14. VI.		Samenanlage	**1,9**	**1,4**

Kapitel II:

Verhalten von Atmung und Gärung gegen Blausäure.

a) Empfindlichkeit gegen Blausäure.

Wenn man die Atmung von Keimlingen in verschiedenem Alter auf ihre Empfindlichkeit gegen n/1000 Blausäure untersucht, so findet man diese um so größer, je jünger die Keimlinge sind und je größer daher ihre Atmung ist. Und zwar führt die Hemmung der Atmung durch n/1000 Blausäure immer auf etwa denselben Wert, nämlich auf etwa Q_{O_2} 1; die niedrige Atmung ganz alter und etiolierter Keimlinge wird daher durch n/1000 KCN gar nicht mehr gehemmt. Umgekehrt aber läßt sich, besonders bei etiolierten oder verhungerten (d. h. vom Samen abgeschnittenen und dann mehrere Tage im Dunkeln gehaltenen) Keimlingen die Atmung durch Zucker bis aufs Dreifache steigern. Diese durch Zuckerlösung gesteigerte Atmung wird nun durch Blausäure ähnlich gehemmt, wie die ungesteigerte Atmung der jungen Keimlinge, d. h. bis zum Wert der Atmung in zuckerfreier Lösung. Während die verschiedene Empfindlichkeit der Zuckeratmung und autotrophen Atmung mit dem Verhalten der Chlorella übereinstimmt[1], wie ich es auch bei der Mehrzahl der anderen untersuchten Algenarten fand, ergibt sich andererseits, daß wenigstens teilweise die höhere Atmung der jungen Keimlinge auf ihrem Zuckergehalt beruhen muß. Allerdings ist auch die Atmung der nicht etiolierten älteren Keimlinge verringert und wird durch Zucker nur wenig oder gar nicht gesteigert. Die anaerobe Gärung wird, ebenso wie sonst, durch n/1000 Blausäure

Tabelle VII.

Blausäureempfindlichkeit verschiedener Pflanzenteile, insbesondere von Keimlingen verschiedenen Alters (alles in n/1000 KCN).

Nr.	Datum	Organ	Alter Tage	Q_{O_2}	Q_{O_2} in KCN	Hemmung %
1	28. VI.	Keimlinge, 10–15 mm	4	4,3	1,05	75
2	25. VI.	„ 10—20 „	6	4,2	1,2	61
3	21. VI.	„ 20—40 „	8	4,1	1,7	58
4	24. VI.	„ 40—50 „	10	3,0	1,0	65
5	4. VII.	Etiolierte Keimlinge, 100—150 mm	34	1,30	1,0	23
6	10. VI.	Etiolierte verhungerte Keimlinge, etwa 100 mm		0,80	0,80	0
7	30. VI.	Blatt	30	1,70	0,6	65
8	1. VII.	Stengel (zerschnitten)	31	1,6	1,0	38
9	30. VI.	Wurzel	30	1,5	0,8	47
10	20. IX.	Große junge Blätter	112	1,8	0,8	56
11	21. IX.	Ältere kleine Blätter	113	2,3	0,8	65
12	21. IX.	Stengel (zerschnitten)	113	2,0	0,7	65

[1] *Emerson*, Journ. General Physiol. **10**, 469, 1927.

nicht gehemmt; durch Zucker wird sie auch in den Fällen, wo die Atmung hierdurch gesteigert wird, nur wenig oder gar nicht erhöht. In der Tabelle VII ist die Abhängigkeit der Hemmungsstärke gegenüber Blausäure von dem Alter der Keimlinge dargestellt, ebenso für junge grüne Pflanzen und Blätter. Man sieht, daß die Q_{O_2}-Werte unter KCN-Wirkung fast alle gleich sind. Das reziproke Verhalten gegenüber Blausäure und Zucker ergibt sich aus Tabelle VIII, wo die Blausäurehemmung in zuckerfreier und zuckerhaltiger Ringerlösung angegeben ist.

Tabelle VIII.

Zucker- und Blausäureempfindlichkeit von Atmung und Gärung.

Nr.	Datum	Alter und Ernährung der Keimlinge	Q_{O_2}				$Q_{CO_2}^{N_2}$	
			in Ringerlösung	in Ringerlösung + n/1000 Blausäure	in Zucker (0,2 %)	in Zucker + n/1000 KCN	in Ringerlösung	in Zucker (0,2 %)
1	21. VI.	Frische Keimlinge, 8 Tage alt	4,1	1,7	3,1	1,7	1,75	1,2
2	24. VI.	Frische Keimlinge, 10 Tage alt, gut ernährt	3,0	1,1	3,2	1,2	1,4	1,4
3	16. VI.	Verhungerte Keimlinge, 14 Tage alt	0,8	0,8	2,2	0,8	0,8	1,2
4	28. VI.	Etiolierte Keimlinge, 26 Tage alt	1,0	0,8	1,3	1,0	0,5	0,5

b) Aufhebung der Verkoppelung von Atmung und Gärung (Pasteursche Reaktion) durch KCN.

In der vorhergehenden Arbeit wurde beschrieben, daß bei Algen unter Blausäurewirkung die Gärung in Zuckerlösung auch in Gegenwart von Luft wieder erscheint, obwohl ja noch ein Atmungsrest fortbesteht, der an sich groß genug wäre, die Gärung zu unterdrücken, und der der Atmungsgröße in zuckerfreier Lösung entspricht. Man konnte dies entweder so deuten, daß die autotrophe Atmung auch in Zuckerlösung persistiert und als ein von der Zuckeratmung unabhängiger Prozeß die Gärung nicht beeinflußt, oder aber, daß die Blausäure die Verkoppelung zwischen Atmung und Gärung aufhebt und daher die fortbestehende Atmung die Gärung nicht mehr beeinflußt. In diesem Falle würde die Blausäure sich bei den Algen so verhalten, wie es nach *Warburg* der Blausäureäthylester — nicht aber die Blausäure — gegenüber Tumorzellen tut[1]. Dieser hemmt nämlich in Konzentrationen von 10^{-3} n

[1] *O. Warburg*, diese Zeitschr. **172**, 432, 1926.

nicht die Atmung, wohl aber die Wirkung der Atmung auf die Milchsäuregärung, so daß diese in Sauerstoff ebenso groß wird wie in Stickstoff. Die Versuche an Lathyrus-Keimlingen beweisen, daß tatsächlich diese letztere Deutung zutrifft. Denn man kann sowohl bei alten wie bei jungen Keimlingen eine KCN-Konzentration finden, wo die Atmung noch nicht herabgesetzt wird, aber trotzdem ein Teil der Gärung wieder erscheint. Geht man zu etwas höheren Blausäurekonzentrationen über, so erscheint nunmehr die Gärung in Luft in derselben Höhe wie in Stickstoff bei nur teilweiser Hemmung der Atmung. Die Verkoppelung von Atmung und Gärung, die „*Pasteur*sche Reaktion", wird daher zweifellos durch Blausäure gehemmt, und zwar stärker als die Atmung selbst, andererseits aber auch nicht so vollständig, wie es bei den Tumorzellen durch den Blausäureäthylester geschieht. Dieser Zusammenhang ist von theoretischem Interesse, weil er zeigt, daß zwischen Blausäure und Blausäureäthylester in ihrer Wirkung kein prinzipieller Unterschied besteht. Im allgemeinen tritt die Hemmung der *Pasteur*schen Reaktion durch Blausäure nicht in Erscheinung, weil die Atmungshemmung noch größer ist. Dann muß ja die Gärung sowieso auftreten. Da jedoch die Atmung der grünen Pflanzen besonders unempfindlich gegen Blausäure ist, überwiegt hier die Wirkung auf die *Pasteur*sche Reaktion. Dies ist in Übereinstimmung mit der *Warburg*schen Theorie, daß sowohl die Atmung wie die *Pasteur*sche Reaktion Schwermetallkatalysen sind, die sich aber Komplexbildnern gegenüber

Tabelle IX.

„*Pasteur*sche Reaktion" mit und ohne Blausäure.

Nr.	Länge der Keimlinge	Konzentration n Blausäure	Q_{O_2}	$Q^L_{CO_2}$	$Q^N_{CO_2}$
1	Junge Keimlinge, 5 bis 10 mm	0	3,1	0	
		$2 \cdot 10^{-5}$	2,6	0	
		$1{,}4 \cdot 10^{-4}$	**3,5**	**0,85**	
		$1 \cdot 10^{-3}$	1,8	1,3	
2	20 bis 40 mm	0	4,5	0	
		$2 \cdot 10^{-5}$	4,75	0	
		$1 \cdot 10^{-4}$	**4,9**	**1,2**	
		$1 \cdot 10^{-3}$	2,6	2,2	
3	30 bis 40 mm	0	1,65	0,0	2,21
		$1 \cdot 10^{-3}$	**1,70**	**2,0**	**2,33**
4	10 Tage alt, 50 mm	0	3,3	0	1,78
		$1 \cdot 10^{-3}$	**2,18**	**1,51**	**1,71**
5	100 bis 150 mm, etioliert	0	1,3	0	
		$2 \cdot 10^{-5}$	1,3	0	
		$1{,}4 \cdot 10^{-4}$	**1,28**	**0,27**	**0,68**
		$1 \cdot 10^{-3}$	**1,05**	**0,42**	

nicht genau gleich verhalten, wie es ja auch die Atmung selbst in den verschiedenen Zellgattungen nicht tut. Die Versuche sind in der Tabelle IX dargestellt.

Zusammenfassung.

Die Arbeit stellt einen Versuch dar, bei den grünen Pflanzen einen Zusammenhang zwischen den Stoffwechselgrößen und dem Wachstums- und Entwicklungszustand aufzuzeigen, wobei neben der Sauerstoffatmung auch die anaerobe Gärung berücksichtigt wird. Obgleich das Material noch der Vervollständigung bedarf, scheint es, daß die Gärung unter ähnlichen Umständen erhöht ist, wie es nach *O. Warburg* bei den tierischen Geweben der Fall ist, nämlich beim embryonalen Wachstum. Beim Vergleich der absoluten Größen der Atmung mit den Ergebnissen älterer Autoren ist zu berücksichtigen, daß diese häufig auf die zureichende Sauerstoffversorgung der Gewebe ungenügend geachtet und das Trockengewicht des lebenden Materials (unter Ausschluß der verholzten Teile) nicht bestimmt haben.

Im ersten Teil der Arbeit wird gezeigt, daß Atmung und Gärung in Keimlingen mit zunehmendem Alter sinken, und zwar letztere stärker. Von den grünen Pflanzenteilen hat der Sproß die höchste Atmung, aber keine sehr große Gärung. Bei den Blütenteilen ist beides in der Samenanlage besonders hoch und stimmt etwa mit den Stoffwechselgrößen junger Keimlinge überein. Nur bei intakten Samen ist die Sauerstoffversorgung nicht hinreichend, um in Luft die Gärung zum Verschwinden zu bringen; doch ist dies nach Zerschneidung der Fall.

Im zweiten Teil wird gezeigt, daß die Blausäureempfindlichkeit der Atmung älterer Keimlinge geringer ist als die jüngerer, während die durch Zucker gesteigerte Atmung stets hemmbar bleibt. Es tritt aber bei einer gewissen Blausäurekonzentration, die die Atmung nicht oder nur wenig hemmt, bereits die anaerobe Gärung auf, d. h. es verschwindet die Wirkung der Atmung auf die Gärung.

Am Schluß dieser Arbeit möchte ich Herrn Professor *Meyerhof* meinen besten Dank ausdrücken für die Freundlichkeit, mit der er mich in seinem Laboratorium aufgenommen hat, und die große Bereitwilligkeit, mit der er mich mit seinen Ratschlägen während der Ausführung der Arbeit unterstützt hat.

Zur Kenntnis des Serumglobulins.

Von

L. Reiner.

(Aus dem Hygienischen Institut der k. ung. Elisabeth-Universität in Pécs.)

(Eingegangen am 15. Oktober 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Aus Blutserum kann man bekanntlich durch 33%ige Sättigung mit Ammonsulfat einen Eiweißkörper fällen, der sich sowohl physikalisch wie auch chemisch ähnlich verhält wie der aus dem Serum bei der Dialyse sich ausscheidende Körper. Im allgemeinen hält man diese beiden Körper für identisch; sie sind hauptsächlich durch die erwähnten physikalischen Eigenschaften gekennzeichnet und werden „Euglobuline" genannt. Man unterscheidet diesen Stoff von einem ihm einigermaßen ähnlichen Serumbestandteil, der nach der 33%igen Sättigung mit Ammonsulfat oder nach der Dialyse noch in Lösung bleibt und erst bei 50%iger Sättigung ausscheidet. Diesen nennt man „Pseudoglobulin".

Der Globulingehalt des Serums ist sehr schwankend und von der angewandten Fällungsmethode abhängig. Es sind Einwirkungen bekannt (Erwärmung auf 40° oder 55 bis 60°) die den Euglobulingehalt vermindern bzw. steigern. Nach *Moll* (17) verwandelt sich dabei das Pseudoglobulin in Euglobulin und umgekehrt. Tatsächlich ist es nicht schwer, aus der sogenannten Pseudoglobulinfraktion des Serums einen dem Euglobulin ähnlichen Niederschlag herzustellen. Es sind zahlreiche Methoden für die Darstellung des sogenannten „künstlichen Globulins" bekannt, deren Wesen anscheinend darin liegt, daß man das Eiweiß dehydratisiert und dadurch seine Löslichkeit in 33%igem Ammonsulfat vermindert. Eine solche Wirkung zeigen auch lipoidartige Stoffe (damit sind in Äther und Alkohol lösliche Stoffe gemeint), wenn sie durch das Eiweiß gebunden werden. *Jarisch* (13) und später *Matsumura* (16) gelang es zu zeigen, daß Albumine durch Addition von Fettsäuren bezüglich ihrer Löslichkeit in destilliertem Wasser und 33%igem Ammonsulfat den Globulinen ähnlich werden. Vorbedingungen zur Entstehung derartiger Additionsprodukte sind auch im Serum bzw. Blut vorhanden. Man könnte demnach annehmen, daß das Serumglobulin ein Eiweiß ist, das seine charakteristischen Eigenschaften der Addition lipoidartiger Stoffe verdankt. Die Schwankungen, denen man bei der Bestimmung der physikalischen Eigenschaften des

Globulins begegnet und die die Darstellung [*Haslam* (10, 11)] und Bestimmung des Globulins so sehr erschweren, wären in dem Falle dadurch zu erklären, daß die Menge und Zusammensetzung der addierten Lipoide veränderlich sind.

H. Chick (3) lenkte zuerst die Aufmerksamkeit darauf, daß das Globulin, wenn man es durch wiederholtes Fällen und Wiederauflösen zu reinigen versucht, seine physikalisch-chemischen Eigenschaften ändert (denaturiert wird) und daß gleichzeitig der Phosphorgehalt zunimmt. Das Zunehmen des Phosphorgehalts brachte *Chick* mit dem Lipoidgehalt des Niederschlages in Zusammenhang. Dies schien berechtigt zu sein, weil aus den Untersuchungen von *Hardy* (7), *Mansfeld* (15), *Forssmann* (5) bekannt ist, daß das Lipoid schwer von den Serumeiweißkörpern zu trennen ist, und wenn man aus dem nativen Serum das Globulin fällt, so geht ein großer Teil des Lipoids in den Niederschlag über.

Von den neueren Untersuchungen scheinen hauptsächlich diejenigen von *Sörensen* (23) und *Hartley* (9) die Auffassungsweise zu stützen, daß das Globulin ein Additionsprodukt von wasserlöslichem Eiweiß und Lipoid ist. In den Versuchen von *Sörensen* sehen wir die Erfahrungen von *Chick* bestätigt. Er fand auch, daß nach wiederholter Fällung des Globulins der Phosphorgehalt im Niederschlag wächst und die Löslichkeit abnimmt. *Hartley* extrahiert Sera nach einer Methode von *Hardy* und *Gardiner* (8) und findet, daß sich das dabei entstehende, hauptsächlich aus den Serumeiweißkörpern bestehende Pulver in destilliertem Wasser restlos auflöst. Das könnte bedeuten, daß nach entsprechender Extraktion alles Serumeiweiß in destilliertem Wasser löslich würde, und daß das in destilliertem Wasser nicht lösliche Globulin während des Verfahrens verschwände.

Von obigen Untersuchungen ausgehend, habe ich mich bemüht, aus dem mit Äther und Alkohol extrahierten Serum das dem lipoidfreien Globulin entsprechende Eiweiß herzustellen. Hierzu wurden vielfach serologisch aktive Sera verwendet (wassermannpositive), da es sich letzten Endes darum handelte, die Relation der Immunstoffe und des Globulins zu erkennen.

Im ersten Teil der vorliegenden Mitteilung berichte ich von den Versuchen, die sich auf die Extraktion der Sera und auf die Herstellung und Reinigung des Globulins beziehen, im zweiten Teil von denen, die von einigen physikalischen Eigenschaften des so gewonnenen Stoffes und deren Vergleich mit den physikalischen Eigenschaften des nicht extrahierten Globulins handeln.

I. Die Extraktion der Sera und Darstellung und Reinigung des Globulins.

1. *Die Methode der Extraktion.*

Zur Extraktion verwendete ich absoluten Alkohol und Äther. Ersteren bereitete ich, indem ich 96%igen Alkohol über geglühtem Kupfersulfat einige Tage lang stehen ließ und dann destillierte. Den Äther ließ ich erst mehrere Tage über wasserfreiem $CaCl_2$ und dann einige Tage über metallischem Na stehen. Die hauptsächlich aus Na-Alkoholat bestehende weiße Schicht, die das metallische Na schnell überzog, schlug ich mindestens täglich mit einem Glasstab ab. Als der Äther nach erneutem Hinzufügen



von reinem Na überhaupt nicht mehr perlte und nach längerem Stehen auch durch Schütteln sich kaum noch größere Gasblasen bildeten, destillierte ich ihn. Nun wurde in einem dickwandigen Gefäß eine Kältemischung von — 22° C hergestellt und in einer mit Holzwolle gefüllten Kiste aufbewahrt. Die Kältemischung diente dazu, eine in einem dickwandigen, länglichen Becherglase befindliche Extraktionsmischung aus 70 ccm absolutem Äther und 30 ccm absolutem Alkohol abzukühlen. Als die Mischung — 20° erreicht hatte, fügte ich tropfenweise unter starkem Rühren 10 ccm des zu extrahierenden Serums hinzu und ließ sie danach 2 Stunden stehen. Ich achtete darauf, daß die Äther-Alkohol-Mischung während des ganzen Prozesses zwischen — 22° und — 18° C blieb. Inzwischen bereitete ich im anderen Teil der Kiste eine Vorrichtung vor, die dazu dienen sollte, die Äther-Alkohol-Mischung von den ausgefällten Serumbestandteilen in der Kälte abzufiltrieren. Sie bestand aus einer in einem Eimer stehenden Saugflasche, an der eine mit einem doppelwandigen Blechmantel umgebene Nutsche angebracht war. In dem Blechmantel kreiste die aus der Kältemischung abgesaugte Flüssigkeit von — 20° C. Der mit Holzwolle umgebene Eimer war bis zum obersten Rande des Blechmantels mit der Kältemischung gefüllt. Die Saugflasche verband ich mit einer Wasserpumpe und filtrierte zuerst bei kräftigem Saugen, dann wusch ich den Niederschlag in zahlreichen Teilen mit mindestens 200 ccm auf — 20° C abgekühltem absoluten Äther aus. Das Waschen stellte ich erst ein, als der Niederschlag sich in ein vollkommen trockenes feines Pulver verwandelt hatte. Dann übertrug ich den Niederschlag in eine vorher entfettete Soxhlet-Hülse, stellte diese in einen Exsikkator mit konzentrierter Schwefelsäure, den ich in kurzen Zwischenräumen mehrmals evakuierte. Von hier kam das Serum in den Soxhlet-Apparat, wo es 16 Stunden lang mit absolutem Äther extrahiert wurde. Den Äther gelang es teils im Exsikkator, teils durch langes Stehen an trockenem Ort so weit zu entfernen, daß der Niederschlag keinen Äthergeruch mehr hatte. Das so gewonnene feine weiße Pulver wurde in einer dem ursprünglichen Volumen (10 ccm) entsprechenden physiologischen Lösung (NaCl, Normosal) gelöst und das Serum dadurch „rekonstruiert". Das Pulver selbst ist hygroskopisch und in Wasser sehr leicht löslich. Das rekonstruierte Serum habe ich in vielen Fällen nach der beschriebenen Methode von neuem extrahiert. Die von mir angewandte Methode unterscheidet sich im wesentlichen nicht von der *Hardy* und *Gardiner*schen. Ich wich nur so weit von ihr ab, wie die äußeren Umstände — Fehlen des Kühlraumes usw. — es notwendig machten.

Von der Vollständigkeit der Extraktion überzeugte ich mich, indem ich das Pulver mit absolutem Alkohol warm extrahierte. Ich fand, daß aus dem zweimal extrahierten Serum auch mit warmem absoluten Alkohol meßbare Mengen von Lipoiden sich nicht mehr extrahieren ließen.

Auf ähnliche Weise versuchte ich auch, das Globulin zu extrahieren. Aus 1 : 3 verdünntem Serum stellte ich auf die in unserem Laboratorium gebräuchliche elektrodialytische Weise [vgl. *L. Reiner* (20)] Globulin her, welches ich in physiologischem Medium in einem dem Serum entsprechenden Volumen löste und extrahierte. Das so gewonnene Pulver war aber, obschon ein wenig gequollen, nur zu sehr geringem Teil löslich. Der lösliche Teil, soweit er von Immunserum herstammte, erwies sich als sehr aktiv [vgl. *Reiner* und *Török* (22)]. *Wenn man aber bei der Extraktion das Globulin in einer konzentrierten Lösung verwendet, z. B. das aus 50 ccm Serum gewonnene Globulin in 10 ccm Normosal auflöst und dann extrahiert, dann*

gewinnt man ein Pulver, welches in Normosal fast vollständig löslich ist. Die Bedeutung dieses Verhaltens wird weiter unten diskutiert.

2. *Die Darstellung von extrahiertem Globulin.*

Da ich durch Extraktion die anorganischen Bestandteile des Serums wahrscheinlich nur zu einem kleinen Teil aus dem Niederschlag entfernt hatte, mußte ich mich durch besondere Versuche davon überzeugen, ob die Eiweißkörper tatsächlich in destilliertem Wasser löslich geworden waren. Zu diesem Zweck elektrodialysierte ich die rekonstruierten Sera. Ich fand, daß nach einer Elektrodialyse von einigen Minuten auf der gegen die Anode liegenden Seite ein reichlicher wolkenartiger Niederschlag entstand, genau so wie bei den nicht extrahierten Sera. Obschon ich keine dahingehende Analysen gemacht habe — aus folgendem werden wir sehen, daß dies zwecklos gewesen wäre —, konnte ich grob feststellen, daß die Menge des Niederschlags nicht weniger war als die, die sich aus nicht extrahiertem Serum fällen ließ. Der Unterschied ist hauptsächlich der, daß letzterer Niederschlag grünlich braun, salbenartig ist, während wir bei ersterem nur wenig gefärbte Flocken gewinnen. Dieser Unterschied ist offenbar auf den großen Lipoidgehalt des aus nativem Serum gewonnenen Globulins zurückzuführen.

Diesen Versuch habe ich wiederholt mit zweimal extrahiertem Serum ausgeführt, immer mit demselben Ergebnis. *Demnach ist die Annahme, daß Globulin ein Additionsprodukt von Lipoid und Eiweiß ist, nicht stichhaltig,* soweit man unter Addition eine durch die Extraktion trennbare Bindung der Lipoide versteht. Diejenigen, die bisher nach der Methode von *Hardy* und *Gardiner* gearbeitet haben und auf Grund ihrer Versuche zu obigem Schluß gelangten, zogen nicht in Betracht, daß der aus extrahiertem Serum gewonnene Niederschlag noch genügend Salz enthält, um in liopidfreiem Medium das Globulin in Lösung zu halten.

3. *Die Reinigung des extrahierten Globulins.*

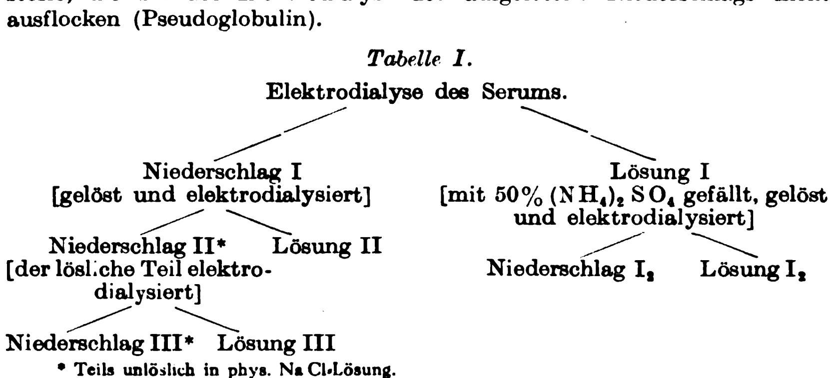
Ich versuchte jetzt, das aus extrahiertem Serum gewonnene Globulin mittels wiederholter Elektrodialyse zu reinigen. Ich dachte, daß, falls in dem von *Sörensen* und *Chick* hergestellten Niederschlag die Zunahme des Phosphorgehalts und die Abnahme der Löslichkeit tatsächlich durch die Zunahme an Lipoid verursacht würde, dann könnte man vielleicht aus *extrahiertem* Serum ein Globulin herstellen, *welches sich mit Hilfe der Elektrodialyse wiederholt reinigen läßt, ohne während des Prozesses seine physikalischen Eigenschaften zu ändern.* Meine Versuche zeigten jedoch das Gegenteil.

Das aus dem 1 : 3 verdünnten Serum ausgeschiedene Globulin (Niederschlag I) wusch ich in destilliertem Wasser aus und löste es in Normosal auf. Dabei erhielt ich eine leicht opalisierende Lösung. In Lösungen, die keine H^+-Regulatoren enthalten, gelingt das Auflösen noch weniger vollständig. Diese Lösung elektrodialysierte ich von neuem und erhielt wieder einen Niederschlag (Niederschlag II); diesen zentrifugierte ich, wusch ihn mit destilliertem Wasser, und um die Wiederauflösung zu fördern, zerrieb ich ihn in einem dickwandigen Gefäß mit Normosal. Ich fand, *daß sich nur ein kleiner Teil des Niederschlags löste,* der größere Teil blieb ungelöst. Ich versuchte, den Niederschlag in dem elektrodialytischen Rest der ursprünglichen Lösung (Lösung I) zu lösen, auch das gelang nicht. *Sörensen* behauptet,

daß das fraktioniert gereinigte Globulin an Löslichkeit abnimmt. Wenn die Beobachtungen tatsächlich auf die verminderte Löslichkeit zurückzuführen wären, dann müßte sich der Niederschlag in großer Menge physiologischer Lösung lösen. Die Menge des unlöslichen Niederschlags ist indessen weitgehend unabhängig von dem Volumen der Salzlösung, in der man ihn auflösen will. Als ich den löslichen Teil des zweiten Niederschlags aufs neue elektrodialysierte, erhielt ich wieder einen Niederschlag (Niederschlag III), der sich ähnlich verhielt wie der zweite und eine eiweißhaltige Lösung. Die Niederschläge enthalten also auch in Wasser lösliche Eiweißstoffe, die bei der Elektrodialyse des aufgelösten Niederschlags nicht ausflocken (Pseudoglobulin).

Tabelle I.

Elektrodialyse des Serums.



* Teils unlöslich in phys. Na Cl-Lösung.

Als ich die bei der ersten Dialyse gewonnenen Reste (Lösung I) mit verschieden konzentrierten Ammonsulfatlösungen vermischte, sah ich, daß in Lösung I noch bei 35%iger Sättigung[1] sich reichlicher Niederschlag bildete. Der bei der zweiten Dialyse gewonnene Rest (Lösung II) gab nur bei 40%iger Sättigung Niederschlag und schließlich der Rest der dritten Dialyse (Lösung III) nur bei 45%iger Sättigung.

In allen diesen Lösungen ist Euglobulin enthalten, welches sich absondern läßt, wenn man ein Teil des wasserlöslichen Eiweißes durch Ausfällen mit Ammonsulfat entfernt. So gab z. B. Lösung I mit 50%igem Ammonsulfat reichlichen Niederschlag. Diesen löste ich auf und elektrodialysierte ihn, worauf ich einen dem Niederschlag II ähnlichen, in physiologischem Medium teilweise unlöslichen Niederschlag (I_2) erhielt. Durch Kontrollversuche überzeugte ich mich davon, daß die Versuche auch dann ähnlich verlaufen, wenn ich mit gewöhnlicher Dialyse arbeitete.

Tabelle II.

Löslichkeit des elektrodialytischen Restes in Ammonsulfat.

	45%	40%	35%	30%	25%
I. Lösung	+	+	+	±	−
I_2. „	+	+	−	−	−
II. „	+	+	−	−	−
III. „	+	−	−	−	−

[1] Die Sättigung bedeutet in jedem Falle das Volumprozent einer gesättigten Ammonsulfatlösung. Z. B. 45 ccm Ammonsulfatlösung auf 100 ccm gefüllt ist 45%ige Sättigung.

Zusammenfassend können wir sagen, daß extrahiertes Serum bei der Fraktionierung durch Ammonsulfat oder Dialyse sich ähnlich verhält wie nicht extrahiertes (s. *Sörensen*, l. c.). Nach wiederholtem Ausflocken erhält man auch nur *Fraktionen, die teilweise aus in destilliertem Wasser löslichem (Pseudoglobulin) teils unlöslichem (Euglobulin) Eiweiß bestehen. Diese lassen sich nicht vollständig voneinander trennen.* Enthält eine Fraktion weniger lösliche Stoffe, dann scheidet sich bei der Dialyse mehr Niederschlag ab; dieser Niederschlag ist aber größtenteils unlöslich (denaturiert).

4. Diskussion der Versuche.

Zweifellos zeigen die Versuche, daß *das Globulin kein Additionsprodukt des Lipoids und eines wasserlöslichen Eiweißkörpers ist.* Es könnte sich höchstens um eine chemische Verbindung handeln, die sich durch die angewandten Methoden nicht lösen läßt. Auch dann ist es nicht das Lipoid, welches das oben beschriebene eigentümliche Verhalten des Globulins verursacht; nämlich, daß das Pseudoglobulin sich anscheinend in Euglobulin verwandeln kann.

Die Flockbarkeit des extrahierten Globulins hängt auch in großem Maße von den physikalischen Eigenschaften des Mediums ab. So verwandelt sich die Flockbarkeit des Globulins auch dann, wenn wir das Serum *verdünnen*. Daher *zeigen die Methoden, die das Globulin durch einfaches Fällen bestimmen, nicht den Globulingehalt an, sondern vielmehr die Flockbarkeit* bzw. *Löslichkeit.*

Nach *Sörensen* gibt es viele Globuline, die aus zwei Komponenten bestehen, und zwar aus wasserunlöslichem Euglobulin (E) und wasserlöslichem Pseudoglobulin (P). Die Formel für diese Globuline wäre $Em\,Pn$, wobei m und n beliebige ganze Zahlen sind. Je mehr das P (also je größer n) ist, um so löslicher ist das betreffende Globulin, und je mehr das E (also je größer m) ist, desto unlöslicher ist es. Die verschiedenen Globuline befinden sich im Gleichgewicht, und wenn wir z. B. aus einer Lösung alle Globuline entfernt haben, in denen das Verhältnis von E und P größer ist als n/m, (was bei der Elektrodialyse der Fall sein kann), dann werden diese Globuline, falls man den Niederschlag auflöst, entsprechend ersetzt, während die Menge der Globuline, in denen das Verhältnis E zu P viel kleiner ist als n/m, entsprechend abnimmt. Diese Hypothese entspricht beiläufig der Erfahrung. Obige Versuche haben aber gezeigt, daß die Fällbarkeit des Globulins auch von der Verdünnung des Serums in großem Maße abhängt; diese Erscheinung erinnert an die bekannte Schutzkolloidwirkung der wasserlöslichen Eiweißstoffe. Daß man die *Sörensen*sche Fassung einigermaßen modifizieren muß, zeigt besonders überzeugend das Verhalten des wasserunlöslichen Serumeiweißes beim *Hardy-Gardiner*-Prozeß.

Wir haben gesehen, daß der gegen Ausflockung schützende Stoff *auch gegen eine Denaturierung während des genannten Extraktionsverfahrens schützt, falls er in einer Konzentration wie im Vollserum vorhanden ist.* Nimmt aber die Konzentration des schützenden Stoffes ab, wie das der Fall ist, wenn man das elektrodialytisch abgeschiedene Globulin in einem dem Serum entsprechenden Volumen löst, dann wird bei der Extraktion ein großer Teil des Globulins denaturiert. Nach *Sörensen* sollte man glauben, daß es hierbei auf das Verhältnis zwischen den *E*- und *P*-Substanzen ankommt. Das ist aber nicht der Fall; *man kann das Fünffache des im Serum befindlichen Globulins extrahieren, ohne es dabei zu denaturieren, wenn man es fünfmal so konzentriert verwendet, wie es im Serum war. Das Verhältnis E zu P blieb dasselbe wie oben, nur die Konzentration, d. h. das Verhältnis von E und P zum Volumen ist größer geworden.*

Neuerdings wurde dieses eigenartige Verhalten des Globulins von *Wo. Ostwald* (19) eingehend erörtert und darauf hingewiesen, daß nach den Arbeiten von *Buzágh* (2) und *Neuenstein* (18) diese Erscheinung bei der kolloidalen Auflösung eines an sich unlöslichen Niederschlages durch ein Peptisationsmittel immer — auch bei anorganischen Stoffen — wieder zu finden ist. Meines Erachtens stimmt diese Auffassungsweise mit der *Sörensen*schen so weit überein, daß das wie üblich dargestellte Euglobulin und Pseudoglobulin keine einheitlichen Stoffe sind. Nach den hier mitgeteilten Versuchen ist der eine Stoff (wahrscheinlich der Hauptbestandteil) ein in Wasser unlösliches Eiweiß, der andere, das Peptisationsmittel, ist vorläufig unbekannt, vermutlich ist es ein wasserlösliches Eiweiß. Bezüglich des Reaktionsmechanismus sind die beiden Forscher verschiedener Meinung. Nach *Wo. Ostwald* handelt es sich um einen Adsorptionsvorgang, nach *Sörensen* um eine chemische Reaktion. Es wird wohl heute allgemein angenommen, daß diese beiden Begriffe, die anscheinend das Entgegengesetzte bedeuten, so umfangreich sind, daß sie auch gemeinsame Gebiete der Erscheinungen umfassen. Daß der Vorgang ein „par excellence“ kolloidchemischer ist, kann nicht bezweifelt werden. Das Bestreben, derartige Erscheinungen durch bekannte chemische und physikalische zu erklären, muß wohl allgemein freudig begrüßt werden.

Bei Erwägungen über den Mechanismus der Reaktion zwischen dem Globulin und dem schützenden Stoff muß man beachten, daß der Vorgang in salzhaltigen Medien ganz anders verläuft, als in salzfreien. Eine bestimmte Menge des schützenden Stoffes kann in salzhaltigen Medien viel mehr Globulin in Lösung halten als in destilliertem Wasser. Dies kann eine Erklärung darin finden, daß die schützende Wirkung in salzhaltigen Medien größer ist. (Man könnte an Adsorptionsladung oder Änderung der Aktivität denken.) In diesem Falle dürfte

bei wiederholter Elektrodialyse die Löslichkeit sich (auch in physiologischem Medium) nicht vermindern. Da jedoch dies der Fall ist, muß man annehmen, ***daß das Reaktionsprodukt von Globulin und schützendem Stoff in salzarmer Lösung dissoziiert.*** Eine ähnliche Dissoziation findet bei der Elektrodialyse von Hämoglobin statt; als eine Folge davon scheidet Globin aus. Auf Grund dieses analogen Verhaltens könnte man vielleicht annehmen, daß das Globulin und der schützende Stoff ebenso wie das Globin und der Blutfarbstoff in eine salzartige Verbindung eingehen. Mit kolloidchemischen Erfahrungen würde das übereinstimmen, da die Reaktion zwischen einem Schutzkolloid und einem hydrophoben Kolloid meistens auf Ladungsverschiedenheit beruht (s. *Freundlich*, Kapillarchemie, S. 811, 6). Die Begünstigung dieser Salzbildung durch Neutralsalze wäre durch ihre ladungserhöhende Wirkung [vgl. *Linderström-Lang* (14), *L. Reiner* (21)] erklärbar.

Nach dem bisher Gesagten wäre es zu erwarten, daß die beiden im sogenannten Globulin befindlichen wasserlöslichen und wasserunlöslichen Körper auch bezüglich ihres elektrochemischen Verhaltens verschieden sind. Hätte diese Erwartung sich bestätigt, so hätte man die beiden Körper auf Grund dieser Eigenschaft voneinander trennen können. Die Beschreibung solcher Bestrebungen befindet sich im folgenden Abschnitt.

II. Der isoelektrische Punkt und die Dissoziation des extrahierten Globulins auf Grund von Wanderungsgeschwindigkeitsmessungen.

1. Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes durch Ausflockung.

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes schien geeignet, um festzustellen, 1. ob sich das extrahierte Globulin von dem aus nicht extrahiertem Serum hergestellten unterscheidet, und 2. ob der Globulin genannte elektrodialytische Niederschlag ein einheitlicher Stoff ist oder, der Vorstellung von *Sörensen* entsprechend, eine Mischung von verschiedenen Globulinen. In letzterem Falle wäre zu erwarten, daß nicht nur die Löslichkeit von dem Verhältnis von E zu P abhängt, sondern auch die Lage des isoelektrischen Punktes.

Wenn man den isoelektrischen Punkt des aus elektrodialytischem Niederschlag hergestellten Globulins durch Ausflocken zu bestimmen versucht (man benutzt dazu 1 : 5 verdünnte n/10 Puffergemische), dann erhält man eine sehr breite isoelektrische Zone, die sich von p_H 4,0 bis 5,8 erstreckt. In diesem Bereich fällt — wenn auch nicht symmetrisch — die Zahl, die man mit Hilfe der elektrodialytischen Methode (Membranhydrolyse) als isoelektrischen Punkt des Globulins gewinnt (5,40, s. l. c., S. 127). Worauf die Entstehung dieser breiten Zone zurückzuführen ist, ist noch nicht geklärt. Auf Grund der *Sörensen*schen Auffassung könnte man erwarten, daß man es mit der Aneinanderreihung verschiedener Stoffe mit einander naheliegenden isoelektrischen Punkten zu tun hat, die vielleicht der Globulinreihe von *Sörensen* entsprechen. Um diese Frage zu entscheiden, flockte ich einen Teil des Globulins bei p_H 5,3 und einen anderen Teil bei 5,5 aus

Die Niederschläge löste ich dann in Normosal auf und bestimmte wieder die isoelektrische Flockbarkeit, indem ich die Lösungen mit einer 1 : 5 verdünnten Pufferreihe versetzt habe. Es zeigte sich, daß beide Lösungen die im ersten Fall gefundene Zone ergaben. Das bei p_H 5,3 ausgeflockte Globulin ist also, nach dem isoelektrischen Punkt zu urteilen, identisch mit dem bei p_H 5,5 ausgeflockten. *Globulinverbindungen mit verschiedenen isoelektrischen Punkten konnte ich nicht nachweisen.*

Tabelle III.

Fällungsversuche in der isoelektrischen Zone.

Geflockt bei	p_H			
	4,5	5,0	5,3	5,5
p_H 5,3	+	++	+++	++
p_H 5,5	+	++	+++	++

2. Methodik der Wanderungsgeschwindigkeitsmessungen.

Weiterhin wollte ich den isoleektrischen Punkt und die Dissoziation des Globulins durch Wanderungsgeschwindigkeitsmessungen bestimmen. Bei Hämoglobin und Hühnereialbumin fand ich, daß die Änderung der Wanderungsgeschwindigkeit mit der H^+-Konzentration für das betreffende Eiweiß charakteristisch ist und bei sehr verdünnten Lösungen proportional zur Änderung der Dissoziation gesetzt werden kann.

a) Die Wanderungsgeschwindigkeit des Globulins haben seit *Hardy* auch *Fodor* (4) und *Adolf* (1) gemessen. Diese Messungen orientieren uns nicht hinreichend über die Dissoziation des Globulins, weil sie den Einfluß der Änderung der H^+-Konzentration nicht verfolgt haben, und weil sie nicht unter Bedingungen vorgenommen worden sind, die eine konstante Wanderungsgeschwindigkeit während des Versuchs hätten voraussetzen lassen können. Auch kann man nicht annehmen, daß unter diesen Versuchsbedingungen das zur Wanderungsgeschwindigkeit proportionale elektrokinetische Potential proportional zur Dissoziation ist.

Die Messung der kataphoretischen Wanderungsgeschwindigkeit können wir in einer U-Röhre auf die Weise vornehmen, daß wir die Verschiebung der Grenzlinie zwischen der Eiweißlösung und der Elektrolytlösung messen, wenn ein Strom von bestimmter Spannung eine bestimmte Zeitlang durch die U-Röhre läuft. Die Verschiebung ist direkt proportional zur Spannung, Zeit und umgekehrt proportional zur Länge des Apparates (von e_1-Elektrode bis e_2-Elektrode, s. Abb. 1). Bei Stoffen, die durch die Änderung der H^+-Konzentration ihre Ladung ändern, ist bei einer bestimmten H^+-Konzentration die Beweglichkeit der Weg, den ein Eiweißteilchen bzw. das Durchschnitts-Eiweißteilchen und so auch die Grenzschicht bei 1 Volt/cm Spannung in einer Sekunde zurücklegt. Um aber die Beweglichkeit aus der gemessenen Verschiebung der gemessenen Gesamtspannung und der Länge des Apparates berechnen zu können, *muß der Spannungsabfall in jedem Teile des Apparates gleich* sein und während des ganzen Versuchs gleich bleiben.

Die Konstruktion der bisher benutzten Apparate hat die Verwirklichung obiger Versuchsbedingungen nicht ermöglicht, weil die in der Nähe der Elektroden entstehenden Elektrolyte (Säure, Alkali usw.) leicht in den

Teil des Apparates eindringen können, in dem die Wanderung vor sich geht, was zur Folge hat, daß der Spannungsabfall während des Versuchs in der Nähe der Elektroden geringer wird, und an den Stellen wo die Wanderung stattfindet, meistens zunimmt, und zwar auf *unkontrollierbare Art.* Um das zu verhindern, ist es üblich, zwischen Elektroden und U-Gefäß eine Agarbrücke einzuschalten; auch bei dem weiter unten beschriebenen Apparat wurde dieser Griff benutzt. — Ist die Leitfähigkeit der Eiweißlösung und des über sie geschichteten Elektrolyts nicht gleich, so entsteht an der Berührungslinie ein Spannungssprung, der wiederum die Wanderung der Grenzschicht beträchtlich und unkontrollierbar beeinflußt. Um während des ganzen Versuchs die Leitfähigkeit der Eiweißschicht und der überschichteten Lösung gleich zu erhalten, *genügt es nicht, sie zu Beginn des Versuchs gleichzumachen*; denn da die Zusammensetzung der Lösungen verschieden ist, sind die Überführungszahlen der einzelnen Ionarten auch verschieden, so daß während des Prozesses die Leitfähigkeit der beiden Lösungen sehr schnell verschieden wird. Die Folge davon ist, daß die beiden Grenzflächen der Eiweißschicht oft nicht mit gleicher Geschwindigkeit wandern, und daß *das Volumen der Eiweißschicht sich vergrößert oder verkleinert.* Solche *Versuche sind natürlich nicht brauchbar.* — Die durchschnittliche Wanderungsgeschwindigkeit kann zum elektrokinetischen Potential nur dann proportional sein, *wenn die Eiweißlösung genügend verdünnt und ihr Ionengehalt äußerst gering ist, und wenn sie keine Ionen enthält, die das elektrokinetische Potential besonders beeinflussen.* Dies ist erreicht, wenn man unter Bedingungen arbeitet, unter welchen verschiedene Pufferlösungen von gleicher H^+-Konzentration dieselbe Wanderungsgeschwindigkeit ergeben.

Bei dem Apparat, den ich benutzte, sorgte ich dafür, daß aus den Elektrodengefäßen kein Elektrolyt in die U-Röhre dringen konnte. Und beim Bereiten der Eiweißlösung fügte ich zu der Pufferlösung eine so kleine Menge Globulin hinzu, daß die *Leitfähigkeit des Eiweißes, im Vergleich zu denen der übrigen Elektrolyte verschwindend war.* Die für die Überschichtung verwendete Pufferlösung verdünnte ich mit so viel physiologischer Lösung, wie das Verhältnis von Pufferlösung und Globulinstammlösung in der Mittelschicht war. *Dadurch wurde erreicht, daß die Leitfähigkeit der beiden benachbarten Schichten annähernd gleich war (Maximalabweichung 2%), und da der Unterschied in der Zusammensetzung der beiden Schichten nur der war, daß die eine außer den gemeinsamen Bestandteilen auch noch eine geringe Menge Eiweiß enthielt (0,1 bis 0,2%), blieb auch die Leitfähigkeit während einer Versuchsdauer von 4 bis 5 Stunden erhalten.*

Der benutzte Apparat (s. Abb. 1) bestand aus einer mit 4 Hähnen versehenen U-Röhre und 2 Elektrodenteilen; letztere waren in die U-Röhre hineingeschliffen und mit Stahlfedern daran befestigt. Der Querschnitt der U-Röhre war überall gleich, und die Bohrung der 4 Hähne hatte ebenfalls den gleichen Querschnitt. Beim Füllen goß ich zuerst die Eiweißlösung in den „Mittelteil“, zwischen den beiden unteren Hähnen, und nachdem ich die Hähne geschlossen hatte, spülte ich den rechten und linken Schenkel der U-Röhre aus, füllte ihn bis zum Schliff mit der entsprechenden Pufferlösung und schloß dann die rechten und linken oberen Hähne. Das so begrenzte Gebiet ist der „rechte“ bzw. der „linke“ Schenkel. In diesen Röhrenabteilungen ging die Wanderung des Eiweißes vor sich. Die Elektrodengefäße bestanden aus 4 Teilen: *a* dem eigentlichen Elektrodengefäß, b_1 der Agarbrücke und b_2 Nivellier-Kapillarröhre, *c* dem Spülgefäß

und d dem Verbindungsgefäß, worin je eine bis zur U-Röhre hinabreichende Elektrode e_1, e_2 zum Messen der Spannung festgelötet war, an beiden Seiten des Verbindungsgefäßes waren zwei Röhren f_1 und f_2 angebracht. Diese wurden vor dem Beginn des Versuchs durch Gummiröhre und T-Stück mit einem Nivelliergefäß verbunden. Auf die Weise wurde im Apparat bei geschlossenen Hähnen der hydrostatische Druck ausgeglichen. Dann wurden die Gummiröhren mit einem Quetschhahn bei f_1 und f_2 geschlossen, die Verbindung unterbrochen und die 4 Hähne vorsichtig geöffnet. Den der Agarbrücke entsprechenden Teil der Röhre füllte ich mit 5%igem Agar, das 10% KCl enthielt, und zwar so, daß die nach oben gebogenen Teile dieser Röhren leer blieben und das sich etwa auflösende Agar sich in diesen Röhrenteilen sammelte. Die Agarbrücken haben den Nachteil, daß sie eine elektroendosmotische Wanderung des Wassers bewirken können, die auf der Seite der Kathode und Anode in der gleichen Richtung vor sich geht (d. h. das Wasser wandert von der einen Elektrode nach der anderen). Diese Wirkung ist sehr geringfügig und im allgemeinen nicht wahrzunehmen. Trotzdem hielt ich es für gut, mit den Agarbrücken parallel

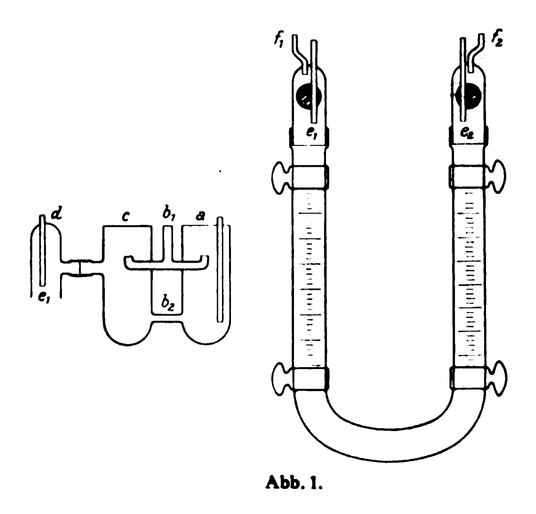


Abb. 1.

Kapillarröhren anzubringen, die den gleichmäßigen hydrostatischen Druck während des Versuches sicherten. Da der Widerstand in diesen im Vergleich zur Agarbrücke sehr groß ist, nimmt die Lösung in ihnen an der Stromleitung fast gar nicht teil. Die Elektrodenflüssigkeiten können also aus dem Gefäß a nicht herauskommen, und das aus den Agarbrücken dringende KCl verdünnt sich in den Gefäßen c beträchtlich. In der U-Röhre verändert sich die Elektrolytkonzentration durch Überführung auch bei sehr langen Versuchen nicht. Die Spannung mißt man mehrmals zwischen zwei Punkten des Apparates, zwischen denen die Spannung nach dem bisher Gesagten als gleichmäßig vorauszusetzen ist (e_1, e_2).

Die Messungen wurden mit einem *Hartmann* und *Braun* schen Spannungsverteiler und Kompensator ausgeführt. Bei den Berechnungen wurden Durchschnittswerte aus stündlich vorgenommenen Bestimmungen verwendet.

b) *Eichung des Apparates.* Zur Berechnung der Spannung pro Zentimeter müssen wir die Entfernung (l) zwischen e_1 und e_2 kennen. Zu diesem Zweck bestimmte ich durch Leitfähigkeitsmessung die Widerstandskapazität (C) zwischen diesen beiden Punkten des Gefäßes, desgleichen auch das Volumen (v), indem ich den Apparat bis e_1 bzw. e_2 aus einer Bürette anfüllte. Daraus ist die Länge auf Grund der Gleichung $l = \sqrt{Cv}$ zu berechnen. Bei Apparat I ist $C = 30{,}2$, $v = 52{,}1$ woraus $l = 39{,}7$ cm ist. Bei Apparat II ist $C = 36{,}44$, $v = 45{,}25$, woraus $l = 40{,}96$ cm ist. Man erhält die gleichen Längen, wenn man die Mitte zwischen dem äußeren und inneren Umkreis der U-Röhre nimmt. Aus obigen Zahlen ergab sich der Querschnitt des Apparates I als 1,314 qcm und des Apparates II als 1,111 qcm.

Mit Rücksicht darauf, daß die sehr verdünnten Globulinlösungen sehr wenig oder gar nicht opaleszent waren, konnte man die Wanderungsgeschwindigkeit nicht durch Beobachten der Grenzschichtverschiebung messen. Es war zweckmäßiger, jene Menge Eiweiß zu bestimmen, welche in die rechte und die linke Röhre wanderte. Man berechnete dann das entsprechende Volumen der ursprünglich im mittleren Teil vorhanden gewesenen Eiweißlösung. Um die Wanderung in Zentimeter zu erhalten, wurde diese Zahl durch den Querschnitt des Apparates dividiert. Die gesamte Wanderung dividiert durch das Potential pro Zentimeter (Volt/cm) und durch die Zeit (in Sekunden) ergibt die Wanderungsgeschwindigkeit in $\frac{\text{cm}^2}{\text{Volt-sec}}$ Einheiten.

Das Eiweiß konnte man mit dem Nephelometer mit hinlänglicher Genauigkeit bestimmen, da es nur auf relative Werte ankam. Zu 10 ccm Lösung wurden 4 ccm destillierten Wassers und 1 ccm 20%iger Sulfosalicylsäure hinzugefügt, geschüttelt und 10 Minuten lang stehengelassen; danach wurde das Trübungsverhältnis zwischen der Ausgangslösung und der nach sorgfältiger Durchmischung von der rechten und linken Seite abpipettierten Lösung bestimmt. Die Zahl der zurückgelegten Kubikzentimeter war aus dem nephelometrischen Verhältnis zu berechnen, indem dasselbe mit dem Volumen der entsprechenden Seitenröhre multipliziert wurde. Bei Apparat I war das Volumen der rechten Seite 14,00, das der linken 13,55 ccm. Bei Apparat II rechts 10,10 ccm, links 10,80 ccm.

c) *Die Wanderungsgeschwindigkeit des Globulins.* Wenn wir eine Globulinlösung mit einer Puffermischung n/30 oder n/40 Acetat, Phosphat oder Borat vermischen, erhalten wir, wie oben gezeigt, eine Suspension, welche sich nach einigen Stunden größtenteils setzt, ein Teil des Globulins aber bleibt in Lösung, s. I. Teil. Zu Orientierungsversuchen über die Wanderungsrichtung in der Nähe des isoelektrischen Punktes wurden solche Lösungen benutzt. Wie aus der nächsten Tabelle zu ersehen ist, erhalten wir, übereinstimmend mit den Versuchen *Hardys* und anderer, eine breite isoelektrische Zone, worin keine Wanderung stattfindet, und die sich wie bei Fällungsversuchen von p_H 4,0 bis p_H 5,8 erstreckt. Doppelseitige Wanderung (s. *Fodor, Adolf*) konnte ich nicht feststellen, oder wenigstens nicht mehr, als sich auf eine sehr geringe und beim Öffnen der Hähne unvermeidliche Konvektion zurückführen ließ.

Bei den *quantitativen* Versuchen überzeugte ich mich davon, daß die Steigerung der Konzentration des Salzes die Breite der isoelektrischen Zone verringert. Derartig konzentrierte Salzlösungen, die das Globulin

Tabelle IV.

Die Richtung der Wanderung bei der Kataphorese in salzfreien Medien.

p_H	p_H gemessen	Die Ladung der linken Elektrode	Richtung
3,8	—	—	links
4,0	4,03	+	0
4,7	—	—	0
5,0	—	+	0
5,4	5,47	—	0
5,5	—	+	0
5,6	—	+	0
5,8	—	+	links
6,0	—	+	links

vollständig lösten, sind bei kataphoretischen Versuchen unanwendbar, denn die Leitfähigkeit dieser ist sehr beträchtlich, und es entsteht oft Konvektion, entgegengesetzte Wanderung an den Glaswänden. Die folgende Tabelle zeigt die Wanderungsgeschwindigkeit des Globulins in Lösungen von verschiedener H^+-Konzentration und Abb. 2 die Änderung der Wan-

Tabelle V.

Versuche über die Wanderungsgeschwindigkeit des Globulins.

Puffer	p_H	Apparat	Volt/cm	Die Wanderung in ccm	Die Wanderung in cm	Die Richtung der Wanderung ***		Nephelometrischer Quotient	Zeit Sek.	Wanderungsgeschwindigk. $\frac{cm^2}{Voltsec}$. 10^5
Acetat	3,6*	I	1,08	1,76	1,34	r.	—	1,26	14 400	8,64
„	4,0*	I	1,36	1,88	1,42	„	—	1,34	14 400	7,58
„	4,0*	I	1,33	1,50	1,14	„	—	1,07	10 980	7,81
„	4,5*	I	1,49	0,528	0,401	l.	—	0,309	10 800	2,49
„	4,8*	I	1,23	0,355	0,270	„	—	0,262	14 400	1,52
„	5,2*	II	1,13	0	0		0	∞	11 400	0
„	5,8*	II	1,41	0,345	0,302	„	+	0,329	16 500	1,30
Phosphat	6,0	II	1,45	1,54	1,35	„	+	1,47	13 800	6,74
„	6,5	II	1,40	1,27	1,12	r.	+	1,30	10 800	7,63
„	7,0	I	1,21	1,63	1,24	„	+	1,20	15 600	6,58
„	7,0	I	1,39	2,32	1,76	l.	+	1,71	16 200	7,85
„	7,8**	II	1,25	1,04	0,91	r.	+	1,06	13 200	5,53
„	7,8	II	1,37	1,74	1,53	„	+	1,79	14 400	7,81
Borat	9,5	I	1,23	1,42	1,08	l.	+	1,05	14 800	5,94

* In m/60 KCl-Lösung. — ** p_H gemessen. — *** r. = rechts, l. = links.

derungsgeschwindigkeit mit der Änderung des p_H. Man sieht, daß die Wanderungsgeschwindigkeit in der Nähe des isoelektrischen Punktes (p_H 5,4) sich kaum ändert, bei p_H 6,0 jedoch bzw. bei p_H 3,6 das Maximum erreicht und dann bei allen gemessenen p_H (innerhalb des Versuchsfehlers) konstant bleibt. Die Versuchsfehler erreichen in einigen Fällen sogar $\pm$ 15 bis 20%, was trotzdem nicht hindern kann, wie auch Abb. 2 zeigt, den charakteristischen Verlauf der Kurve zu erkennen. An den Stellen nämlich, wo sich die Wanderungsgeschwindigkeit tatsächlich ändert, vervielfacht sie sich innerhalb 1 p_H[1].

Falls wir annehmen, daß die Wanderungsgeschwindigkeit des Globulins proportional zu der Dissoziation desselben ist, und dies ist, wie gezeigt

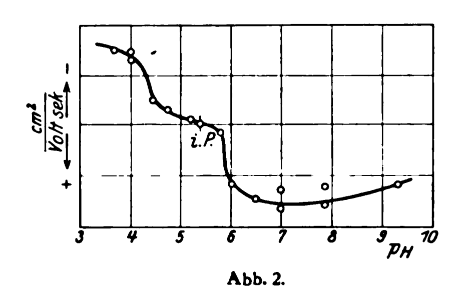


Abb. 2.

wurde, in unserem Falle in einem weiten p_H-Bereich gestattet, dann können wir folgende Folgerungen ziehen:

1. Die Dissoziation des Globulins ist im Gegensatz zu den meisten bisher untersuchten Eiweißstoffen in der Nähe des isoelektrischen Punktes sehr gering. Aus kataphoretischen Versuchen, übereinstimmend mit Fällungsversuchen, ergibt sich, *daß das Globulin eine breite isoelektrische Zone hat.* Solchen isoelektrischen Zonen begegnen wir bei Ampholyten, die eine saure und eine alkalische ionogene Gruppe haben, in dem Falle, wenn die Dissoziationskonstanten der ionogenen Gruppen recht fern voneinander liegen. Die wasserlöslichen Eiweißstoffe weisen meistens *einen ausgeprägten isoelektrischen Punkt auf.* Beim Edestin fand jedoch *Hitchcock* (12) durch elektrometrische Titration eine wie oben beschriebene isoelektrische Zone.

2. *Die Dissoziation* findet sowohl an der alkalischen Seite wie auch an der sauren Seite in einem *verhältnismäßig geringen* p_H-Bereich statt. Dies weist darauf hin, daß die Dissoziationskonstanten der ionogenen Gruppen nahe beieinander liegen.

---

[1] Versuche mit Hämoglobin führten zu der Erfahrung, daß die oben beschriebene kataphoretische Methode, wenn die Wanderung durch Verschiebung der Grenzschicht gemessen wird, innerhalb 5% übereinstimmende Resultate ergibt. Das Arbeiten mit farblosen Flüssigkeiten wird zum Teil dadurch erschwert, daß man die eventuell erfolgte Konvektion nicht bemerken kann, und daß auf diese Weise Versuche in die Versuchsserie gelangen, die wegen eines groben Fehlers zu verwerfen wären. Weiterhin war im vorliegenden Falle auch der mikroanalytische Fehler beträchtlich (etwa $\pm$ 5%).



3. Die Säurebindungsfähigkeit des Globulins ist etwas größer als die Alkalibindungsfähigkeit. Das gleiche geht auch aus *Adolfs* kataphoretischen Versuchen hervor.

Diese Folgerungen werden durch die isoelektrische Theorie der Ampholyten qualitativ bestätigt.

Bei der Dissoziation eines polyvalenten Ampholyts entstehen die folgenden Molekül- bzw. Ionarten.

$$P, P^{-}, P^{2-}, P^{3-} \ldots P^{n-} \quad \text{und} \quad P^{+}, P^{2+}, P^{3+} \ldots P^{m+}*. \tag{1}$$

Die Dissoziation des Ampholyts als Säure kann, wenn der Aktivitätskoeffizient zu 1 angenommen wird, mit Hilfe der Dissoziationskonstanten (K) und mit der H^{+}-Konzentration folgendermaßen in Äquivalenten ausgedrückt werden:

$$(P)\left\{\frac{K_1}{(H^+)} + \frac{2K_1K_2}{(H^+)^2} + \frac{3K_1K_2K_3}{(H^+)^3} + \cdots \frac{nK_1K_2\ldots K_n}{(H^+)^n}\right\} \tag{2}$$

und als Lauge:

$$(P')\left\{\frac{K'}{K_w}H^+) + \frac{2K_1'K_2'}{K_w^2}(H^+)^2 + \cdots \frac{mK_1'K_2'\ldots K_m'}{K_w^m}(H^+)^3\right\}.^{**} \tag{3}$$

Den isoelektrischen Punkt definieren wir als jenen, wo sämtliche negativen wie positiven Ladungen des Eiweißstoffes gleich sind. Dann ist auch $(P) = (P')$ und

$$\left.\begin{aligned}\frac{K_1}{(H^+)} + \frac{2K_1K_2}{(H^+)^2} + \cdots \frac{nK_1K_2\ldots K_n}{(H^+)^n} = \frac{K'}{K_w}(H^+) + \frac{2K_1'K_2'}{K_w^2}(H^+)_2 \\ \cdots + \frac{mK_1'K_2'\ldots K_m'}{K_w^m}(H)^m.\end{aligned}\right\} \tag{4}$$

Wenn

$$\frac{K_2}{(H^+)} \ll \frac{K_1}{(H^+)}$$

und wenn

$$\frac{K_2'}{K_w}(H^+) \ll \frac{K_1'}{K_w}(H^+),$$

dann können außer dem ersten Glied die übrigen vernachlässigt werden. Die Lage des isoelektrischen Punktes hängt nur von der ihm am nächsten liegenden Dissoziationskonstanten ab, und die Gleichung verändert sich in die bekannte Gleichung des isoelektrischen Punktes von einem monomonovalenten Ampholyten.

$$(H^+) = \sqrt{\frac{KK_w}{K'}}. \tag{5}$$

Wenn alle ionogenen Gruppen sehr nahe aneinander liegen, dann kann man Gleichung (4) zunächst folgendermaßen schreiben:

$$\frac{K}{(H^+)} + \frac{2K^2}{(H^+)^2} + \cdots \frac{nK^n}{(H^+)^n} = \frac{K'}{K_w}(H^+) + \frac{2K'^2}{K_w^2}(H^+)^2 + \cdots \frac{mK'^m}{K_w^m}(H^+)^m. \tag{6}$$

* Die Zwitterionen werden, wie die undissoziierten mit P bezeichnet.

** K_w Dissoziationskonstante des Wassers.

Es sei

$$\frac{K}{(\mathrm{H}^+)} = x$$

und

$$\frac{K'}{K_w}(\mathrm{H}^+) = y,$$

dann folgt

$$x + 2x^2 + \cdots n x^n = y + 2y^2 + \cdots m y^m \tag{7}$$

und summiert

$$\frac{n x^{n+2} - (n-1)x^{n+1} + x}{(x-1)^2} = \frac{m y^{m+2} - (m-1)y^{m-1} + y}{(y-1)^2}. \tag{8}$$

Wenn hier $n = m$ ist, dann ist $x = y$, und die Gleichung der isoelektrischen H^+-Konzentration ist wiederum (5).

Wenn $n < m$ ist, dann ist $x < y$, das ist

$$\frac{K}{(\mathrm{H}^+)} < \frac{K'}{K_w}(\mathrm{H}^+) \tag{9}$$

und

$$p_K > 2p_\mathrm{H} + p_{K'} - p_{K w}. \tag{10}$$

Beim Globulin haben wir gesehen, daß die Dissoziationskonstanten sehr nahe beieinander liegen; besonders ist dies auf der alkalischen Seite der Fall, wo die Dissoziationskonstante $p_K = 5{,}9$ gesetzt werden kann. Da n etwas größer als m war, so folgt aus (10).

$$p_K > 10{,}8 + 5{,}9 - 14{,}0 = 2{,}7. \tag{11}$$

Tatsächlich sehen wir, daß die Dissoziation schon bei einer viel saureren Reaktion stattfindet als 2,7. Die durchschnittliche Dissoziationskonstante der sauren ionogenen Gruppen ist etwa $p_K = 4{,}3$.

Aus der Lage der Dissoziationsgruppen wird es verständlich, daß die Dissoziation in der Gegend des isoelektrischen Punktes noch sehr gering ist, und daß man dementsprechend beim Globulin eine breite isoelektrische Zone findet. Wegen der Nähe der Dissoziationskonstanten zueinander verläuft die Dissoziation nicht stufenweise (vgl. *L. Reiner*). Auf der sauren Seite ist die Kurve ein wenig abgeflacht zum Zeichen dessen, daß dort die Dissoziationskonstanten etwas weiter aufeinander liegen.

Die Dissoziationskonstanten sämtlicher ionogenen Gruppen sind schwach, deswegen kann man nur eine kleine Menge $^+G^-$-Zwitterion und eine größere Menge G-Moleküle voraussetzen. Bekanntlich nimmt in salzhaltigen Lösungen die Dissoziation der schwachen Elektrolyte zu. Daraus folgt, daß die $^+G^-$-Konzentration in salzhaltigen Lösungen ebenfalls zunehmen muß. Wahrscheinlich ist die Löslichkeit des G-Moleküls viel kleiner als die des $^+G^-$-Zwitterions, und die Löslichkeit des Globulins nimmt, in salzhaltigen Medien hauptsächlich deshalb zu, weil die Konzentration des $^+G^-$-Zwitterions im Verhältnis zur Konzentration der G-Moleküle zunimmt.

Zusammenfassung.

1. Der dem Euglobulin entsprechende Niederschlag läßt sich durch Elektrodialyse auch aus Seren herstellen, die mit *Äther-Alkohol mehrmals gründlich extrahiert sind. Das Euglobulin ist also kein Additionsprodukt*

von Lipoid und Eiweiß. Beim Reinigen oder in fraktionierten Fällen ändert es seine physikalischen Eigenschaften (hauptsächlich die Löslichkeit); zumeist wird es denaturiert. — Der Hauptbestandteil der Globulinfraktionen scheint ein in Wasser und auch im physiologischen Kochsalz praktisch unlöslicher Eiweißstoff zu sein. Im Serum ist er kolloid gelöst. Bei der Dialyse dissoziiert die Verbindung zwischen Schutzkolloid und Globulin, und das sogenannte Euglobulin flockt aus. Nach der ersten Flockung enthält der Niederschlag noch viel Schutzkolloid, es läßt sich in salzhaltigen Medien noch dispergieren (trübe Lösung). Nach wiederholtem Flocken nimmt der Gehalt an Schutzkolloid und damit auch die Dispergierbarkeit des Globulins ab. ***Das Schutzkolloid schützt das Globulin auch gegen die denaturierende Wirkung von Äther-Alkohol.***

2. Das Globulin hat eine breite isoelektrische Zone. Dies ist aus dem Verlauf der kataphoretisch gemessenen Dissoziationskurve erklärlich. Die Dissoziation der ionogenen Gruppen liegt bei p_H 5,9 und zwischen p_H 4,6 und 4,1. Es gelang nicht, Globuline mit verschiedenen isoelektrischen Punkten zu isolieren.

Literatur.

1) *Adolf*, Kolloidchem. Beih. **20**, 363, 1924. — 2) *Buzágh*, Kolloid-Zeitschr. **41**, 169, 1927. — 3) *Chick*, Biochem. Journ. **8**, 419, 1914. — 3) *Fodor*, Kolloid.-Zeitschr. **30**, 313, 1923. — 5) *Forssmann*, diese Zeitschr. **121**, 180, 1921. — 6) *Freundlich*, Kapillarchemie, 2. Aufl. Leipzig, Akad. Verlag, 1922. — 7) *Hardy*, Journ. of Physiol. **33**, 251, 1905. — 8) *Hardy* and *Gardiner*, ebendaselbst **33**, 251, 1910. — 9) *Hartley*, Brit. Journ. of. exper. Pathol. **6**, 180, 1925. — 10) *Haslam*, Journ. of Physiol. **32**, 298, 1905. — 11) *Derselbe*, ebendaselbst **7**, 492, 1913. — 12) *Hitchcock*, Zit. bei Cohn, Phys. Rev. 1925, S. 5. — 13) *Jarisch*, Pflügers Arch. **194**, 337, 1922. — 14) *Linderström-Lang*, C. r. du Lab. Carlsberg 1926, Nr. 6, S. 16. — 15) *Mansfeld*, Zeitschr. f. Physiol. **21**, 20, 1909. — 16) *Matsumura*, Kolloid-Zeitschr. **32**, 173, 1923. — 17) *Moll*, Hofmeisters Beitr. **4**; **7**, 1203, 1904. — 18) *Neuenstein*, Kolloid-Zeitschr. **41**, 183, 1927. — 19) *Wo. Ostwald*, ebendaselbst **41**, 163, 1927. — 20) *Reiner*, ebendaselbst **40**, 123, 1926. — 21) *Derselbe*, ebendaselbst **40**, 327, 1926. — 22) *Reiner* und *Török*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 1927. — 23) *Sörensen*, C. r. des trav. du Lab. Carlsberg 1925, Nr. 11, S. 15.

Die Beschleunigung der Zuckerbildung in der herausgeschnittenen Froschleber durch Strukturzerstörung.

Von

E. J. Lesser.

(Aus dem Laboratorium der städtischen Krankenanstalten in Mannheim.)

(Eingegangen am 17. Oktober 1927.)

Es ist früher[1] ausführlich gezeigt worden, daß die Steigerung der Geschwindigkeit der Zuckerbildung aus dem Leberglykogen in der herausgeschnittenen Froschleber, wie sie durch Durchströmung mit stark hypertonischen Lösungen, durch Adrenalin, durch vorherige Pankreasexstirpation erhalten wird, nicht durch Änderung der Wirkungsbedingungen der Leberdiastase infolge von Änderung der p_H, sondern nur durch Vermehrung der Katalysatorkonzentration, d. h. der wirksamen Diastasemenge erklärt werden kann. Durch Änderung der p_H von 7,44 auf 6,45 konnte nur eine Erhöhung der Zuckerbildung um 90% erhalten werden. Durch die drei anderen, vorher erwähnten Beeinflussungen wurde dagegen eine Steigerung auf 400 bis 600% erhalten. Aus diesen Ergebnissen, ferner aus der Tatsache, daß im unzerkleinerten Froschei keine Glykogenhydrolyse nachweisbar ist, während im zerkleinerten eine sehr beträchtliche gefunden wird, war der Schluß gezogen worden, daß in der Leberzelle eine räumliche Trennung von Glykogen und Diastase bestehe; auf Grund der Beeinflussung der Zuckerbildung der nach dem Verfahren von *Fröhlich* und *Pollak* durchspülten Froschleber, durch homologe Alkohole in isokapillarer Konzentration ist dann die Theorie aufgestellt worden, daß in der herausgeschnittenen Leber des Winterfrosches etwa zwei Drittel der Leberdiastase an Grenzflächen der Zellstruktur adsorbiert und daher unwirksam sind. Diese Adsorption ist reversibel aufhebbar. Gegen diese Theorie ist der Einwand gemacht worden „que le broyage des cellules (du foie par exemple), qui devrait mettre en contact le

---

[1] *Lesser* und *Zipf*, diese Zeitschr. **140**, 435, 439, 1923; *Lesser*, diese Zeitschr. **119**, 108, 1921. Deutsch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 27.

glycogène et la diastase et accentuer ainsi la glycogenolyse, ralentit au contraire cette dernière en comparaison de l'intensité du même phenomène dans le foie excisé intact"[1]. Dieser Einwand ist in der Tat ein sehr berechtigter, obwohl die Angabe, daß die Glykogenhydrolyse durch Zerkleinerung der Leber gehemmt werde, nicht zutreffend ist. Sowohl *I. Bang*[2] als auch *Kerner* und *Lesser*[3] haben nach Strukturzerstörung bei der möglichst blutfrei gespülten Froschleber eine geringe *Vermehrung* des Glykogenschwundes gefunden. Diese Zunahme lag aber den Fehlergrenzen der Bestimmungsmethode zu nahe; *Kerner* und *Lesser* mußten daher die Frage, ob sich durch Strukturzerstörung eine Vermehrung der Glykogenhydrolyse erzielen läßt, offen lassen. Dagegen ergab ihre Arbeit, daß die Kritik, welche *I. Bang* der Arbeit von *Lesser*[4] gewidmet hatte, vollkommen berechtigt gewesen war. Die großen Glykogenabnahmen, welche *Lesser* durch Strukturzerstörung der Leber erhalten hatte, waren auf mangelhafte Entfernung der Blutdiastase zurückzuführen.

Aus diesen Mißerfolgen ergibt sich zweierlei: Die Glykogenmethode ist zu unempfindlich, um sichere Ergebnisse zu zeitigen, und auf die Entfernung der Blutdiastase aus den Lebergefäßen muß die größte Sorgfalt verwendet werden.

Bei den in folgendem zu beschreibenden Versuchen wurde daher nicht die Glykogenabnahme, sondern die Zuckerbildung bestimmt. Die Befreiung der Leber von der Blutdiastase wurde auf folgende Weise zu erreichen gesucht.

Am lebenden Tiere wurden die beiden Aorten am Ursprung aus dem Herzen freigelegt, in die eine wurde peripherwärts eine Kanüle eingebunden und durch diese das ganze Tier mit großen Mengen der von *Barkan, Broemser* und *Hahn*[5] angegebenen Salzlösung (kurz im folgenden als B. L. bezeichnet) durchspült, die aus dem angeschnittenen Ventrikel wieder abfloß. Durchspült wurde etwa 1 Stunde lang mit Mengen von 200 bis 300 ccm B. L. (p_H 7,4 bis 7,55 kolorimetrisch bestimmt). Dann wurde die Leber nach den Vorschriften von *Fröhlich* und *Pollak*[6] präpariert und das herausgeschnittene Organ etwa 45 Minuten lang dauernd unter häufigem Massieren mit etwa 80 ccm B. L. durchspült. Es gelingt auch so nicht, die Leber vollkommen blutkörperchenfrei zu erhalten. Aber bereits nach wenigen Minuten ist die abfließende Flüssigkeit auch nach starkem Massieren der Leber nicht mehr gefärbt, jedoch ganz leicht getrübt. In den Leberläppchen

---

[1] *M. Jacot*, Glycogène, adrénaline et insuline, S. 78. Paris, Masson et Cie., 1926.

[2] *I. Bang*, diese Zeitschr. **56**, 155, 1913.

[3] *Kerner* und *Lesser*, ebenda **102**, 284, 1920.

[4] *Lesser*, ebenda **52**, 471, 1913.

[5] *Barkan, Broemser* und *Hahn*, Zeitschr. f. Biol. **74**, 1, 1921.

[6] *Fröhlich* und *Pollak*, Centralbl. f. Physiol. **26**, 1326, 1912; Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **77**, 265, 1914.

ist nirgends mehr eine Spur von Rotfärbung mit der *Zeiss*schen Binokularlupe zu entdecken. Da ja die Blutdiastase wasserlöslich ist, muß man auf diese Weise ein Organ erhalten, in dem nur noch die Zelldiastase vorhanden sein kann. Nach Unterbrechung der Durchströmung wurden die drei Leberlappen voneinander isoliert und zwischen dicken Lagen von Fließpapier getrocknet, bis keine Flüssigkeit mehr aus der bei der Präparation entstandenen Schnittfläche austrat. Dann wurden sie rasch auf 0,01 g gewogen. Die einzelnen Lappen wogen zwischen 1,5 und 3,5 g. Der Lappen 1 wurde sofort auf Zucker analysiert, indem er unter 2 ccm 94 %igen Alkohols in einer kleinen Reibschale möglichst fein zerrieben wurde. Der Brei wurde mit 94 %igem Alkohol in ein Zentrifugenglas quantitativ übergeführt. Die Gesamtmenge der Flüssigkeit betrug dann etwa 12 ccm. Sie blieb bis zum nächsten Tage stehen. Der Lappen 2 wurde in einer kleinen Reibschale ohne jeden Zusatz zu Brei zerrieben, der Lappen 3 in eine kleine Reibschale gelegt. Die Lappen 2 und 3 kamen dann beide gleichzeitig in eine feuchte Kammer. Die Zeiten der Verreibung der Lappen 1 und 2 wurden mit Stoppuhr markiert. Etwa 60 Minuten nach der Zerkleinerung des Lappens 2 wurde der Fermentprozeß durch Einbringen des Breies in 94 %igen Alkohol unterbrochen, wiederum unter genauer Markierung der Zeit. Endlich wurde der Lappen 3 in derselben Weise wie 1 auf Zucker verarbeitet. Alle drei Zentrifugengläser blieben bis zum nächsten Tage stehen, dann wurde scharf zentrifugiert und der klare alkoholische Extrakt abgegossen. Der Rückstand wurde dreimal mit 66 %igem Alkohol unter jedesmaligem Aufrühren auf der Zentrifuge gewaschen. Sämtliche Waschwässer wurden mit dem ersten Extrakt vereinigt, in eine halbkugelige Glasschale übergeführt und der Alkohol auf dem Wasserbad vorsichtig verjagt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgeschwemmt, quantitativ in ein 50-ccm-Kölbchen übergeführt, mit 1 ccm kolloidalem Eisenhydroxyd und etwas $MgSO_4$ versetzt, auf 50 ccm aufgefüllt und filtriert. Im wasserklaren Filtrat wurde der Zucker nach *Hagedorn-Jensen* ermittelt. Einmal wurde daneben auch die Bestimmung nach dem Mikroverfahren von *Michaelis* ausgeführt. Dabei ergaben sich die in Tabelle I zusammengestellten Werte.

Tabelle I.

Lappen	Nach *Hagedorn-Jensen* mg	Nach *Michaelis* mg	Differenz in Prozenten des *Hagedorn-Jensen*-Wertes
2	11,9	12,5	+ 5
3	5,67	5,45	— 3,9

Die erhaltenen Werte sind also auf etwa 5 % genau. Alle Versuche wurden an kurz zuvor gefangenen männlichen Esculenten ausgeführt.

Die erhaltenen Werte zeigt die Tabelle II.

Man sieht, in allen Versuchen steigt die Zuckerbildung durch Zerstörung der Zellstruktur auf das 3- bis 4,5fache. Die Größenordnung ist dieselbe, wie sie früher für die Beschleunigung der Zuckerbildung der intakten, künstlich durchströmten Leber bei Beeinflussung durch oberflächenaktive Alkohole, durch hypertonische Salzlösung, durch Adrenalin oder durch vorherige Pankreasexstirpation gefunden wurde.

Tabelle II.

Nummer	Datum 1927	Temperatur °C	mg Zucker pro 100 g Leber			mg Traubenzucker neu gebildet pro 1 Std. u 100 g Leber		Durch Zerkleinerung mehr gebildeter Zucker in mg pro 1 Std. und 100 g Leber	Durch Zerkleinerung in 1 Std. gebild. Zucker, wenn die Zuckerbildung des intakten Lappens = 100 gesetzt wird	Bemerkungen
			Lappen vorher analysiert	intakter Lappen	zerriebener Lappen	intakter Lappen	zerriebener Lappen			
1	7. IX.	22	71	189	490	124	440	316	355	
2	12. IX.	18	55	163	361	92	294	202	317	
3	13. IX.	19	44	105	324	61	280	219	445	
4	14. IX.	22,5	51	162	510	106	441	335	416	
5	15. IX.	22	58	118	276	55	232	177	420	
6	5. X.	18	73	175	411	87	270	183	310	Zusatz von je 5 ccm B. L. zu den Leberlappen. Durchleitung von O_2, der 3 % CO_2 enthielt, p_H der Salzlösung 7,5
7	6. X.	20	87	180	341	74	211	137	285	Zusatz von B. L. wie bei 6. Nach Füllung der Gefäße mit O_2, der 3 % CO_2 enthielt, Schütteln im Schüttelapparat, p_H der Salzlösung 7,5
Mittelwert:			62,7	156	388	85,6	309,7	224	356	

Dies spricht dagegen, daß es sich um eine Vermehrung der Zuckerbildung durch Verschiebung der p_H nach der sauren Seite infolge von Milchsäurebildung bei der Strukturzerstörung gehandelt hat. Diese Frage wurde aber noch durch die direkt hierfür angestellten Versuche 6 und 7 untersucht. In diesen beiden Versuchen wurden die Leberlappen in Erlenmeyerkolben von 50 ccm gebracht und sowohl zu dem intakten, wie zu dem zerkleinerten Lappen wurden je 5 ccm B. L. von p_H 7,5 zugesetzt. In Versuch 6 wurde dann durch die beiden hintereinander geschalteten Kolben während des ganzen Versuchs das vorgeschriebene Gasgemisch von 3 % CO_2 und 97 % O_2 geleitet, in Versuch 7 wurden die Kolben mit diesem Gasgemisch gefüllt, mit Gummistopfen verschlossen und im Schüttelapparat um vertikale Achse sanft geschüttelt. Wie man sieht, ändert die Anwesenheit des Kohlensäure-Bicarbonatpuffersystems ($p_H = 7{,}5$) im wesentlichen an dem zu demonstrierenden Vorgange nichts. Die Beschleunigung der Zuckerbildung, welche durch Strukturzerstörung erhalten wird, ist also nicht durch eine Verschiebung der p_H nach der sauren Seite durch Milchsäurebildung bedingt. Bei Zusatz der Pufferlösung fällt aber die Erhöhung der Zuckerbildung durch Strukturzerstörung deutlich geringer aus. Sonst wird pro 1 Stunde und 100 g Leber im Mittel aus 5 Versuchen 250 mg Glucose durch Strukturzerstörung mehr gebildet, bei Zusatz von Pufferlösung nur

160 mg. Dies ist aber nicht Folge einer Änderung der p_H. Wenn man zu Leber*brei* (die zerkleinerten Lappen wogen in Versuch 6 und 7 1,7 und 1,8 g) 5 ccm B. L. zusetzt, so vergrößert man das Reaktionsvolumen etwa um das Dreifache. Dadurch muß eine Verlangsamung der Zuckerbildung eintreten. Dagegen ändert der Zusatz von 5 ccm B. L. zur intakten Leber die Größe des Reaktionsvolumens nicht. Wohl aber könnte dadurch, daß etwa die Hälfte des neu gebildeten Zuckers aus der intakten Leber in die B. L. übertritt, eine Beschleunigung der Zuckerbildung eintreten, infolge Austritts der Hydrolysen*produkte* aus der Leberzelle. Aus dieser Überlegung heraus wurde der größte Teil der Versuche ohne jeden Zusatz von Salzlösung — weder zum intakten, noch zum zerkleinerten Leberlappen — angestellt; nur dann hat man vergleichbare Bedingungen, weil nur dann das Reaktionsvolumen bei beiden Lappen dasselbe ist.

Daß es *Bang* seinerzeit nicht gelang, die Beschleunigung der Zuckerbildung durch Strukturzerstörung zu finden, liegt wohl — abgesehen davon, daß er die Versuche viel zu lange, über 7 bis 10 Stunden, ausdehnte — hauptsächlich daran, daß er zu seinen zerkleinerten Leberlappen etwa die 20fache Menge ihres Gewichtes an destilliertem Wasser zugesetzt hat. Dadurch wurde nicht nur das Reaktionsvolumen ungeheuer vergrößert, sondern auch die Cl′-Konzentration stark herabgesetzt, so daß sich der intakte und der zerkleinerte Leberlappen nicht mehr unter vergleichbaren Bedingungen befanden. Auch die Versuche von *Kerner* und *Lesser* waren in dieser Hinsicht fehlerhaft angeordnet.

Die Betrachtung der in der Tabelle II zusammengestellten Zahlen zeigt weiter, daß es wenig aussichtsvoll ist, das hier gefundene Verhalten auch mit der Glykogenmethode zu untersuchen. Die Mehrbildung an Zucker beträgt 224 mg pro 100 g Leber und Stunde. Der Glykogengehalt der Lebern, der ja leicht in dem Rückstand der Alkoholextraktion bestimmt werden konnte, betrug zwischen 16000 und 17000 mg pro 100 g Leber. Die Mehrbildung an Zucker beträgt also pro Stunde nur etwa 1,5% des Glykogengehaltes. Da die Differenzen im Glykogengehalt der einzelnen Leberlappen bis zu 10 % (*Kerner* und *Lesser* a. a. O.) betragen können, wäre eine große Anzahl von Versuchen nötig, um den Vorgang bei Winterlebern auch mit der Glykogenmethode nachzuweisen.

Von Interesse ist endlich noch der Wert, der für den Zuckergehalt desjenigen Leberlappens gefunden wurde, der möglichst bald nach Unterbrechung der Durchspülung analysiert wurde. Er betrug 62,7 mg-% im Mittel (Minimum 44, Maximum 87). Dieser Wert stimmt mit dem früher von *Bissinger*[1] erhaltenen überein.

[1] *Bissinger*, diese Zeitschr. 185, 229, 1927.

Bissinger fand mit ähnlicher Methode einen Mittelwert von 59 mg-% (Minimum 31, Maximum 104). Ferner fand *Bissinger* den Verteilungskoeffizienten des Traubenzuckers zwischen B. L. und Leber im Mittel zu 0,66. Einer Leber, die 61 mg-% Traubenzucker enthält, würde daher bei Diffusionsgleichgewicht ein Blutplasmazucker von etwa 91 mg-% entsprechen. Nun beträgt der Plasmazucker des Winterfrosches 19 mg-% (Mittel aus 4 Bestimmungen an Fluoridplasma nach *Hagedorn-Jensen*). Dem würde bei Diffusionsgleichgewicht ein Leberzucker von 13 mg-% etwa entsprechen. In der herausgeschnittenen Leber ist also, auch bei Durchspülung mit B. L. bei p_H 7,5 und möglichster Entfernung der Blutdiastase der Zuckerspiegel immer noch etwa 4½ mal so hoch wie in der Leber des lebenden Tieres. Man erkennt hieraus wiederum, wie außerordentlich empfindlich das System Diastase-Glykogen in der Leberzelle ist, ein Punkt der früher bereits eingehend erörtert wurde[1].

[1] *Lesser*, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilkde. **16**, 279, 1919.

Über eine neue Reihe von Reagenzien zur chemischen Fraktionierung von biologisch wirksamem Ausgangsmaterial.

Von

Casimir Funk.

(Aus der biochemischen Abteilung der Staatlichen Hygieneschule, Warschau.)

(Eingegangen am 18. Oktober 1927.)

Die Zahl von Reagenzien, die für die Aufarbeitung von Substanzen von Hormon-, Vitamin- oder Fermenttypus Verwendung finden können, ist leider sehr begrenzt. Insbesondere leidet die moderne Biochemie Mangel an systematischen Methoden, die ähnlich wie bei der qualitativen chemischen Analyse, ein unbekanntes Gemenge in wohldefinierte Gruppen auflösen können. Von solchen Methoden stehen uns nur die klassischen Methoden von *Kossel* und *Kutscher*, weiter ausgearbeitet von *Ackermann*, *Gulewitsch* u. a., zur Verfügung, Methoden, die zur Trennung von Purin-, Pyrimidin-, Hexonbasen usw. dienen. Die Reagenzien, die hier in Frage kommen, eignen sich vorzüglich dazu, um stabile Substanzen voneinander zu trennen und zu identifizieren, versagen aber oft, wenn es sich um labile Substanzen handelt, mit welchen sich die moderne Biochemie besonders jetzt zu befassen hat.

Seit längerer Zeit bin ich damit beschäftigt, um von der Pikrinsäure oder anderen analogen Nitroverbindungen ausgehend, ein System zu bauen, das gestattet, von einem komplizierten Gemenge ausgehend, physiologisch wirksame Substanzen mit möglichst geringer Schädigung der Aktivität abzuscheiden[1].

Die meisten Substanzen, die hier in Frage kommen und von mir oder meinen Mitarbeitern untersucht worden sind, liefern wahrscheinlich Pikrate, Pikrolonate usw., aber von einer Löslichkeit, die ihre Ab-

[1] Eine systematische Durcharbeitung dieser neuen Methoden war mir aus äußeren Gründen nicht möglich gewesen. Am Schluß meines Warschauer Aufenthalts angelangt und zu einer zeitweisen Unterbrechung meiner Tätigkeit gezwungen, werde ich demnächst in einigen Arbeiten meine bisherigen Resultate, mit dieser Methode erlangt, veröffentlichen.



scheidung unmöglich macht. Durch Anwendung von Salzen aber gelingt es, die Verbindungen schwerlöslich zu gestalten und meistens in kristallinischen Fraktionen abzuscheiden. Durch Anwendung verschiedener Metalle hoffte ich die Gemische in Gruppen einzuteilen, indem sich die so erhaltenen Reagenzien viel spezifischer als die freien Säuren selbst verhalten sollten. Daß dies wenigstens teilweise gelang, dafür sprechen die erhaltenen Resultate.

Die neuen Reagenzien, die hier besonders in Frage kamen, waren die Natrium-, Barium-, Blei-, Silber- und Quecksilbersalze der Pikrinsäure, also Metallionen, die sich ohne Schwierigkeit quantitativ aus der Lösung entfernen lassen. Außer der Pikrinsäure kamen auch Pikrolonsäure und Naphtholgelb S in den oben entsprechenden Salzen zur Anwendung. Die Salze der Pikrolonsäure aber erwiesen sich als weniger brauchbar, weil sie zu wenig löslich waren und so zu große Verdünnungen lieferten. Die Anwendung von Naphtholgelb S dagegen erwies sich schon aus dem Grunde nicht vorteilhaft, weil diese Säure auf schonende Weise nur schwer zu entfernen ist. Zwar gelang es, dieselbe als Nitronderivat (der Pikrinsäure analog) zu fällen, doch reißt die Nitronfällung in manchen Fällen auch die aktive Substanz nieder. Dies war z. B. beim Insulin der Fall, während beim Trypsin nach den Angaben von *Kolodziejska* und *Funk*[1] das Enzym sich glatt zurückgewinnen ließ.

Die hier vorliegende Methode wurde mit einigem Erfolg zur Fraktionierung von Trypsin, Pepsin, Pituitrin, Vitamin B und C und Insulin angewandt. Manchmal wurde nur ein bestimmtes Salz benutzt, manchmal dagegen, wo die Natur des Materials es erlaubte, wurde eine systematische Durchführung der neuen Methode, eine Art von biochemischer Analyse versucht. Ich hoffe aber, daß die Methode, durch Heranziehen anderer Salze sowie anderer analogen Säuren, zu dem letztgenannten Zwecke ausgearbeitet werden kann.

Die Salze der Pikrinsäure, die hier in Anwendung kamen, wurden nach den bekannten Methoden[2] dargestellt und durch Umkristallisieren gereinigt. Die Salze der Pikrolonsäure und Naphtholgelb S wurden in analoger Weise wie bei der Pikrinsäure erhalten. Bei der Verarbeitung der erhaltenen Niederschläge wurden in drei Fällen Schwierigkeiten beobachtet, die hier eine besondere Besprechung finden sollen. Das Kupferpikrat, das sich aus den berechneten Mengen von Kupferoxyd oder -acetat und Pikrinsäure glatt darstellen ließ, dissoziert beim Fällen und liefert oft Fällungen von noch unbekannter Zusammen-

[1] *Kolodziejska* und *Funk*, diese Zeitschr. 182, 264, 1927.
[2] Beilsteins Handb. 3. Aufl.

setzung, die kein Kupfer in ionisierbarer Form enthalten. Die zweite Schwierigkeit betrifft die Anwendung von Quecksilberpikrat. Dieses Salz wurde nach üblichen Angaben aus frisch gefälltem Quecksilberoxyd und Pikrinsäure dargestellt. Als Temperatur, bei welcher sich die Salzbildung vollzieht, wird 80° in der Literatur angegeben. Bekannterweise aber geht beim Kochen, aber auch schon bei niedrigerer Temperatur das Quecksilberpikrat in Merkuri-pikrinsäureanhydrid, das das Quecksilber in nicht-ionisierter Form enthält, über. Es wurde deshalb vorgezogen, die Temperatur nicht über 55° zu steigern, indem der Reaktionskolben in Wasser mit Temperaturkontrolle gehalten wurde. Das erhaltene Quecksilberpikrat wurde wieder bei der gleichen Temperatur aus Wasser umkristallisiert. Trotz dieser Vorsichtsmaßregel ist es vorgekommen, daß das Quecksilberpikrat geringe Mengen von dem Anhydrid enthielt. Diese Verunreinigung ist beim Verarbeiten der Niederschläge sehr lästig, weil aus dem Anhydrid weder das Quecksilber noch die Pikrinsäure entfernt werden können, wodurch Vergiftungen von Tieren oder untersuchten Organen vorkommen können. Diese Verunreinigung läßt sich vielleicht durch peinliche analytische Kontrolle der Reinheit des Quecksilberpikrats vermeiden oder auch durch den folgenden Kunstgriff unschädlich machen. Nach den Angaben von *Hantzsch* und Mitarbeitern[1] wird das Merkuri-pikrinsäureanhydrid durch Salzsäure in das leichtlösliche Merkurichlorid-trinitrophenol, durch verdünnte Schwefelsäure dagegen in Merkurihydrat-trinitrophenol, das sogar in siedendem Wasser unlöslich ist, umgewandelt. Es genügt demnach, bei dem Ausschütteln der Pikrinsäure mit verdünnter Schwefelsäure anzusäuern und abzufiltrieren, um die lästige Verunreinigung zu entfernen.

Bei Anwendung der Salze des Naphtholgelb S (Flaviansäure) kommt die Schwierigkeit der Entfernung dieser Säure zum Vorschein. In unseren Fällen können wir uns nicht der Methode bedienen, die von *Kossel* und *Gross*[2] angegeben wurde, weil die hier in Betracht kommenden labilen Substanzen dem Kochen mit Säure nicht widerstehen können. In Analogie mit Pikrinsäure haben wir versucht, die Flaviansäure durch Nitron zu fällen. Zu diesem Zweck habe ich die Verbindung der Flaviansäure und Nitron dargestellt und die Löslichkeit in verdünnter Essigsäure (das Nitron wird in essigsaurer Lösung angewandt) und die Zusammensetzung studiert. 0,557 g Flaviansäure mit Nitronlösung gefällt gaben 1,401 g der Doppelverbindung. Die Theorie für die Verbindung mit 1 Mol. Nitron ist 1,11 g, mit 2 Mol. Nitron 1,66 g. Die

[1] Die Literaturangabe steht mir momentan nicht zur Verfügung.
[2] *Kossel* und *Gross*, Sitzungsber. d. Heidelb. Akad. d. Wiss. Math.-naturwiss. Kl., Abt. B, 1923.



entstandene Verbindung besteht demnach aus 1 Mol. Flaviansäure mit 2 Mol. Nitron. Die Löslichkeit in 10 %iger Essigsäure bei 21° ist 0,0136 %, in Wasser von 20° 0,0032 %. 10,838 mg Substanz lieferten 2,53 mg $BaSO_4$, gef.: 3,2 % S. 6,843 mg Substanz lieferten 0,882 ccm N_2 (739,1, 20°), gef.: 14,3% S, ber.: 3,4 % S und 14,9 % N.

Eine andere Methode zur Entfernung der Flaviansäure wurde beim Insulin ausgearbeitet. Das Insulinflavianat wurde durch Lösen in Sodalösung oder verdünnter Essigsäure und Zusatz von Pikrinsäure in das Flavianatpikrat umgewandelt. Diese letzte Verbindung läßt sich nach dem *Dudley*schen Verfahren durch Anwendung von salzsäurehaltigem Alkohol glatt in das Hydrochlorid überführen. Ich beschreibe hier die beiden Verfahren zur Entfernung der Flaviansäure, weil dieselben auch bei der *Kossel*schen Methode zur Anwendung gebracht werden können.

Die neue Fraktionierungsmethode gestaltet sich gewöhnlich wie folgt. Die wässerigen Extrakte, die verarbeitet werden sollen, werden zuerst zwecks Entfernung der Schwefel-, Salz- und Phosphorsäurereste mit neutraler Bleiacetatlösung gefällt. Die Flüssigkeit wird über Nacht kühl aufbewahrt, um die Fällung so quantitativ wie möglich zu gestalten, da die Säurereste die Salze der Pikrinsäure usw. zersetzen. Nach dem Entfernen des überschüssigen Bleies durch verdünnte Schwefelsäure und der letzten Spuren mit Schwefelwasserstoff (die Prozedur kann natürlich nur da angewandt werden, wo die oben angeführten Reagenzien die Aktivität der zur Untersuchung kommenden Substanzen nicht beeinträchtigen. Ist dies der Fall, dann darf das Blei nur mit verdünnter Schwefelsäure entfernt werden) und nach dem Einengen des Filtrats im Vakuum wird die Flüssigkeit mit gesättigter Pikrinsäure oder, wenn nötig, mit fester Pikrinsäure ausgefällt. Die Pikrate werden auf Aktivität geprüft und eventuell chemisch verarbeitet. Das Filtrat der Pikrinsäurefällung wird dann systematisch mit den verschiedenen Pikraten behandelt, die, um das Volum der Lösung nicht unnütz zu vergrößern, in einer in der Wärme gesättigten Lösung zugesetzt werden. Meistens wurde so vorgegangen, daß zuerst mit Bariumpikrat begonnen wurde. Nach dem Abtrennen der entstandenen Fällung wurde zu dem Filtrat Bleipikrat zugesetzt. Es scheint aber, daß die Barium- und Bleipikrate fast einander gleichwertig sind, indem sie annähernd die gleiche Gruppe der Substanzen niederschlagen. Dann wird Silberpikrat und schließlich Quecksilberpikrat angewandt. Es hat sich nicht als nötig erwiesen, den Überschuß der Reagenzien zu entfernen. Jede der Einzelfraktionen muß natürlich auf die Aktivität und eventuell auch chemisch untersucht werden. Die Fraktionen werden in der Weise zerlegt, daß zuerst die Metalle auf übliche Weise entfernt werden, die Flüssigkeit wird am besten mit verdünnter Schwefelsäure an-

gesäuert, die Pikrinsäure mit Äther erschöpft und die Basen in freiem Zustande oder als Hydrochloride kristallisiert. Auf gleiche Weise muß auch das letzte Filtrat behandelt werden.

Das Verfahren, das weiter ausgebaut werden kann, besitzt gegenüber den bisherigen Methoden den großen Vorteil, daß es die Aktivität von Substanzen, die sehr labil sind wie die Enzyme, nicht merklich beeinträchtigt und sogar oft stabilisiert.

Zusammenfassung.

Eine Methode der Fraktionierung von biologisch wirksamen Substanzen wurde beschrieben, indem die Pikrinsäure und analoge Säuren durch Umwandlung in Salze verschiedener Metalle in eine Reihe von mehr spezifisch wirkenden Reagenzien umgewandelt wurden. Das Verfahren besitzt den Vorzug, die Aktivität des Materials kaum zu beeinflussen.

Vorstudien über das Pepsin.

Von

Helena Elblinger und **Casimir Funk.**

(Aus der biochemischen Abteilung der Staatlichen Hygieneschule, Warschau.)

(Eingegangen am 18. Oktober 1927.)

Die Reinigung der Enzyme hat in der Neuzeit einen großen Aufschwung erhalten, aber gerade was die Reinigung des Pepsins anbelangt, stehen uns nur spärliche Data zur Verfügung. Es ist wahrscheinlich, daß die Hauptfortschritte in dieser Richtung in der Technik gemacht worden sind[1]. In der wissenschaftlichen Literatur der Neuzeit finden wir einige Arbeiten, die für uns von Interesse waren. *Fenger* und *Andrew* (1) reinigten das Pepsin durch Fällung am isoelektrischen Punkt. Es wurde so vorgegangen, daß zuerst das Pepsin bei p_H 3,4 bis 3,6 durch 1 Volumen Aceton gefällt wurde. Die Fällung war schwer in Wasser, aber leicht in angesäuertem Wasser löslich. Weitere Reinigung erfolgte durch Dialyse, das Pepsin fiel bei p_H 2,4 bis 3,85, die reinsten Präparate aber bei 2,4 bis 2,5 aus. Das so gereinigte Produkt verliert seine Wirkung in saurer Lösung. Es ist bemerkenswert, daß die Ausbeuten an Pepsin am besten im Herbst, am schlechtesten im Frühling waren. Hier läßt sich eine Analogie zum Vitaminreichtum der Nahrung aufstellen. Die Reinigungsmethode von *Fenger* und *Andrews* scheint jedenfalls versprechend zu sein. *Marston* (2) und später *Forbes* (3) benutzten die Fällung mit Safranin. *Forbes* verglich die letzte Methode mit der Absorptionsmethode von *Willstätter*. Die Adsorptionsmethode ergab eine 14 malige Reinigung, die Safraninmethode dagegen eine

---

[1] *F. O. Taylor* (Ind. Eng. Chem. **19**, 1202, 1927) gibt in der Besprechung der Fortschritte des Hauses *Parke, Davis & Co.* an, daß im Jahre 1874 das Handelspepsin dieser Firma 12 Teile Eiweiß verdaute. Jetzt wird ein Präparat geliefert, das 15000 Teile Eiweiß verdaut. Ja sogar im Laboratorium wurden Präparate erhalten, die die verdauende Kraft von 1 : 42000 zeigten.



21 malige. Auf die Safraninmethode kommen wir noch zu sprechen, da wir dieselbe nachgeprüft haben.

In Anschluß an die Arbeiten von *Kolodziejska* und *Funk* (4) über das Trypsin dachten wir, die in diesem Falle mit einigem Erfolg benutzten Methoden auch beim Pepsin zu probieren. Doch hier hatten wir mit neuen Schwierigkeiten zu kämpfen. Beim Pepsin gab Pikrinsäure allein nur eine unvollständige Fällung zum Unterschied von Trypsin. Manche Salze der Pikrinsäure ergaben quantitative Fällungen, aus welchen aber das freie Enzym sich schwer regenerieren ließ. Das Pepsin nämlich inaktiviert sich schon beim Stehenlassen, viel schneller noch bei größeren Verdünnungen. Dieser Vorgang wurde schon von *Goulding*, *Borsook* and *Wasteneys* (5) studiert. Ferner werden Pepsinlösungen durch Schütteln oder durch Einleiten von Gasen vollständig inaktiviert, wobei gleichzeitig eine Ausflockung des Enzyms stattfindet. Gelöst in Alkohol oder Aceton, in Gegenwart von Mineralsäuren, wird das Pepsin in eine unlösliche Verbindung übergeführt, wobei das Ferment sich einer weiteren Aufarbeitung entzieht.

Eine Frage, die in unserer Arbeit indirekt berührt worden ist, ist die Identität des Pepsins und Chymosins. Im Laufe der Reinigungsversuche von *Mc Meekin* und *Koch* (6) durch Adsorption an koaguliertes Eiereiweiß, Solution des Enzyms mit Na_2HPO_4, Fällung des Extraktes durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat, wurde das Pepsin 18 mal gereinigt. *Mc Meekin* (7) machte dabei die Beobachtung, die später von *French* (8) in demselben Laboratorium bestätigt wurde, daß das Eieralbumin ungleichmäßig das Pepsin und Chymosin adsorbiert. Bei der Anwendung dieses Verfahrens wurden z. B. 84 bis 92 % des Pepsins erhalten, während von Chymosin 87,5 bis 91% in der Mutterlauge verblieben. Schon vor Jahren versuchten *Funk* und *Niemann* (9), durch fraktionierte Adsorption die beiden Enzyme voneinander zu trennen, aber ohne Erfolg. Es muß hier hervorgehoben werden, daß im Laufe der jetzigen Versuche viele Hunderte von Fällungen und Fraktionierungen ausgeführt worden sind, ohne daß eine Trennung der beiden Fermente zustande kam. Im Gegenteil, eine vollständige Parallelität der Wirkungen wurde stets erhalten, worauf wir gelegentlich in der Arbeit nochmals zurückkommen werden.

Die Arbeit, die hier vorliegt, kann nur als eine Reihe von Vorstudien betrachtet werden, um das Verhalten des Enzyms gegenüber verschiedenen Eingriffen kennenzulernen. Die Reinigung des Pepsins selbst kam erst in zweiter Linie in Betracht. Eine Anzahl von Resultaten wurde aber gewonnen, die zur Reinigung herangezogen werden können. Das wichtigste Ergebnis dieser Arbeit ist die Feststellung der Möglichkeit, daß das Pepsin, in voller Analogie zum



Trypsin, auch aus einem inaktiven Ferment und Kinase bestehen kann. Diese beiden Bestandteile scheinen durch die hier zu beschreibende Prozedur fast gänzlich voneinander getrennt worden zu sein.

Experimenteller Teil.

Die meisten Versuche wurden mit Pepsin *Merck* ausgeführt, obwohl gelegentlich auch andere Fabrikate benutzt wurden. Was die Prüfung der proteolytischen Wirkung anbelangt, so versuchten wir zuerst, dieselben mit dem Mikro-van Slyke-Apparat zu verfolgen. Wie zu erwarten war, waren die Ausschläge so klein, daß wir uns an eine andere Methode wenden mußten. Wir benutzten die Edestinmethode von *Fuld* und *Lewison* (10). Beim Zusatz von allzu großen Pepsinmengen wird manchmal beobachtet, daß beim Aussalzen mit Kochsalz eine Trübung entsteht, die vom Enzym selbst stammt. In solchen Fällen kann der irrtümliche Schluß gezogen werden, daß keine proteolytische Wirkung vorhanden ist. Fast in allen Fällen haben wir zur Kontrolle auch die Chymosinprobe von *Michaelis* und *Rothstein* (11) angesetzt. Auch hier müssen besondere Maßregeln innegehalten werden. Die Probe wird, wie üblich, mit Milch angestellt. Es ist aber viel vorteilhafter, die Proben mit einem löslichen Milchpulver oder speziell gereinigtem Caseinpräparat anzustellen. Wenn solche Präparate fehlen, muß die Milch, besonders in Sommermonaten, auf Eis aufbewahrt werden, da sonst sich ihre Azidität so schnell ändert, daß Ergebnisse, in Abständen von ein paar Stunden gewonnen, nicht miteinander verglichen werden dürfen. Vielmehr müssen alle Tagesbestimmungen fast gleichzeitig angesetzt werden. Noch auf einen anderen Umstand möchten wir aufmerksam machen. Bei zu großen Fermentmengen geht die Verdauung so rasch vor sich, daß die Milch flüssig bleibt und den Anschein erweckt, daß keine Labwirkung stattgefunden hat. Wird das Ferment nun verdünnt, dann kommt die charakteristische Koagulation zum Vorschein. Auch hier kann der Schluß gezogen werden, daß keine Fermentwirkung stattfand, wenn die Enzymverdünnung nicht richtig gewählt wird.

Die Reagenzien, die zur Fällung des Pepsins herangezogen worden sind, schließen sich eng an die neue Fraktionierungsmethode von *Funk* (12) an. Es kamen hier hauptsächlich Salze der Pikrinsäure zur Anwendung. Außer diesen wurde das Verhalten einiger anderer Reagenzien studiert, die eventuell zur Entfernung von Säuren oder Metallen aus der Lösung benutzt werden konnten. Zuvor jedoch haben wir die Stabilität des Pepsins und den Einfluß äußerer Faktoren studiert, um später bei der Fraktionierung Eingriffe zu vermeiden, die die Aktivität des Enzyms beeinflussen.

Einfluß von einigen äußeren Faktoren und manchen Reagenzien auf die Pepsinwirkung.

Schwefelwasserstoff. Durchleiten des Gases während einer Stunde hat keinen merklichen Einfluß auf die Aktivität. Längeres Durchleiten hat eine merkliche Abschwächung zur Folge (vgl. weiter unten über den Einfluß des Schüttelns und der Bewegung).

Sauerstoff. Während die Kontrollflüssigkeit sich in ihrem Aussehen nicht merklich änderte, erlitt die Versuchsflüssigkeit eine Änderung,

die sich in Trübewerden und Ausflockung offenbarte. Die Aktivitätsprüfung nach 48 Stunden zeigte eine bedeutende Abschwächung der Kontrolle (davon weiter unten: die Wirkung der Verdünnung), während die Versuchsflüssigkeit vollständig inaktiviert wurde.

Kohlensäure. Um die Frage zu lösen, ob das letzte Resultat auf Oxydation zurückzuführen war, wurde ein Versuch mit Kohlensäure angesetzt. Die Aktivitätsprüfung erfolgte zuerst jede 1½ Stunde und jedesmal war die Versuchsflüssigkeit schwächer als die Kontrolle. Nach 48 Stunden war die Aktivität gänzlich verschwunden, während die Kontrolle noch die übliche Aktivität zeigte. Die Inaktivierung durch Sauerstoff ist demnach hauptsächlich auf Bewegung und nicht auf Oxydation zurückzuführen.

Einfluß der Bewegung im Vakuum und in der Luftatmosphäre. Um mit Sicherheit die Ursache der Inaktivierung kennenzulernen, wurde ein weiterer Versuch angestellt. Die Pepsinlösung wurde in vier Glasampullen aus Jenaglas unter Thymolzusatz verteilt. Zwei von den Ampullen wurden evakuiert und zugeschmolzen, die anderen zwei einfach verschlossen. Eine der Ampullen wurde geschüttelt, die andere diente als Kontrolle. Die Aktivität nach 74 Stunden an Edestin gemessen war wie folgt.

Ruhe	Bewegung
Kontrolle 0,3 ccm verdaut	Kontrolle trüb und inaktiv
Vakuum 0,25 ccm "	Vakuum " " "

Die Vakuumampulle erwies sich etwas aktiver als die Luftkontrolle, und vielleicht wäre der Unterschied noch größer, wenn das Vakuum besser als 12 mm, wie in unserem Falle, wäre. Sicher ist es, daß das Schütteln das Ferment vollständig inaktiviert.

Verdünnung. Eine Pepsinlösung, die in einem Volumen von 0,007 ccm 2 ccm Milch labte, wurde 10- und 100 mal verdünnt und 24 Stunden stehengelassen. Die Aktivität war wie folgt:

Nr.	Anfangsaktivität in ccm	Nach 24 Stdn.
1	0,007	0,007
2	0,07	0,1
3	0,7	Unwirksam

Wir ersehen daraus, daß, je konzentrierter die Lösung, desto stabiler sie wird.

Wirkung von HCl in Gegenwart von Alkohol und Aceton. Im Laufe unserer Versuche wurde die Beobachtung gemacht, daß das Pepsin

in Gegenwart von HCl und Alkohol oder Aceton in eine unlösliche Verbindung übergeführt wird, aus welcher es bis jetzt nicht gelang, das wirksame Enzym zu regenerieren. Die folgenden Versuche mögen dazu als Beleg dienen.

Zu einer Lösung von 0,1 g Pepsin in 2 ccm Wasser wurden 12 ccm mit HCl leicht angesäuertem Alkohol hinzugefügt. Es entsteht momentan ein weißer Niederschlag, der unlöslich und daher unwirksam ist. Der Niederschlag wurde mit einer 0,5 %igen HCl übergossen und über Nacht im Brutschrank aufbewahrt. Eine Aktivität im Extrakt ließ sich auch jetzt nicht nachweisen. Das gleiche Ergebnis wurde erhalten, wenn statt Alkohol Aceton benutzt wurde. Durch besondere Kontrollen wurde ermittelt, daß weder Alkohol, noch HCl allein auf das Enzym schädlich wirkt. Längeres Stehenlassen von Pepsin mit 0,5 %iger HCl scheint aber auch die Eigenschaften des Enzyms etwas zu ändern.

Merkwürdig ist es, daß, wenn man den Niederschlag von Pepsin mit Silberpikrat statt mit HCl mit Schwefelwasserstoff zerlegt und dann die freien Pikrate in salzsäurehaltigem Alkohol löst, in diesem Falle keine unlösliche Verbindung entsteht. Schwefelwasserstoff vermag demnach das Pepsin in eine Form überzuführen, die mit saurem Alkohol eine lösliche Verbindung liefert.

In Anbetracht des oben Gesagten ist es von Wichtigkeit, zu konstatieren, daß bei Anwendung der Pikrinsäure oder der Pikrate das Pepsin viel *stabiler* wird. Das Pepsin in dieser Form behält seine Aktivität in verdünnten Lösungen viel besser, auch flockt dasselbe beim Schütteln, wie es z. B. bei der Vakuumdestillation geschieht, nicht aus.

Die in diesen Versuchen gewonnenen Erfahrungen sind für die weitere chemische Bearbeitung des Pepsins von Interesse.

Das Verhalten des Pepsins manchen Fällungsreaktionen gegenüber.

Beim Bearbeiten der Niederschläge wurden dieselben stets durch Abschleudern getrennt. Wir sind uns wohl bewußt, daß die meisten von uns hier beschriebenen Fällungsreaktionen als Adsorptionserscheinungen an ausfallende Verunreinigungen betrachtet werden können. Das mag wohl der Fall sein, kann aber, glauben wir, nicht auf alle Fälle ausgedehnt werden. Denn wir haben oft kolloidale und nichtkolloidale Niederschläge erzeugt, ohne eine Spur von Wirksamkeit zu verlieren. Beim Niederschlagen des Pepsins tritt die Komplikation auf, daß in konzentrierten Lösungen oft das Pepsin quantitativ ausfällt, während dasselbe Reagenz in verdünnter Lösung nur kolloidale Fällungen erzeugt, die sich nur schwer abschleudern lassen und schwankende Mengen des Enzyms in der Mutterlauge zurücklassen. Beim Ausäthern

der Pikrinsäure wurde der Scheidetrichter nur durch Umschwenken umgerührt, um die Inaktivierung durch Schütteln zu vermeiden.

Pikrinsäure. Eine Pepsinlösung von 2 g Pepsin in 20 ccm Wasser wurde von in Wasser unlöslichen Bestandteilen abgeschleudert und mit einer gesättigten Pikrinsäurelösung gefällt. Der erhaltene Niederschlag, der auch in Sodalösung löslich ist, wurde durch verdünnte HCl und Äther von Pikrinsäure befreit. Die Aktivität wurde im Niederschlag, sowie in der Mutterlauge gefunden, so daß, im Gegensatz zu Trypsin, das Pepsin nur unvollständig durch Pikrinsäure gefällt wird.

Silberpikrat. 1 g Pepsin in 15 ccm Wasser wurde allmählich mit 140 ccm einer in der Kälte gesättigten Silberpikratlösung gefällt. Nach längerem Stehenlassen wurde der Niederschlag abgetrennt und getrocknet. Ausbeute 545 mg. Die Mutterlauge nach dem Entfernen des Silbers und der Pikrinsäure erwies sich ohne Wirkung, somit war die Fällung vollständig. Der Niederschlag wurde in 0,5 %iger HCl aufgeschwemmt und darin das Silber mit H_2S gefällt. Der Extrakt wurde mit Äther zur Entfernung der Pikrinsäure erschöpft. Die Prüfung der Aktivität ergab, daß die Reinigung eine 2,2 malige war. Die Zersetzung des Niederschlags mit HCl, Trennung von AgCl und Ausschütteln mit Äther ergab das gleiche Resultat. Verdünntere Silberpikratlösungen ergaben nur unvollständige Fällungen.

Bleipikrat. 1 g Pepsin in 18 ccm Wasser wurden mit 133 ccm einer in der Kälte gesättigten Bleipikratlösung gefällt. Der Niederschlag wog 551 mg. Die Fällung erwies sich als vollständig. Der Niederschlag wurde mit 0,2 % Schwefelsäure zerrieben. Zweifache Reinigung. Dieselbe Bleipikratlösung auf die Hälfte verdünnt gab aus 200 mg Pepsin nur 74 mg Niederschlag mit einer 3,1 fachen Reinigung. Wurde der Bleipikratniederschlag quantitativ mit Schwefelsäure zerlegt, die Pikrinsäure entfernt und die überschüssige Schwefelsäure mit Ba-Acetat entfernt und die Fermentlösung mit der gleichen Bleipikratlösung gefällt, so fällt das Pepsin unvollständig und kolloidal aus. Vierfach verdünnte Bleipikratlösungen geben überhaupt schlechte Pepsinausbeuten. Durch Zersetzen der Bleipikratfällungen und Entfernen aller Reagenzien läßt sich das Pepsin durch Alkohol und Äther regenerieren.

Quecksilberpikrat. 0,2 g Pepsin in 10 ccm Wasser wurden mit 3,5 ccm gesättigter Lösung gefällt. Nachdem dieses Volumen zugesetzt wurde, entstanden durch neuen Zusatz von diesem Reagenz neue Niederschläge, die sich aber als inaktiv erwiesen. Der aktive Niederschlag betrug 98,5 mg, derselbe wurde mit 0,5 %iger HCl verrieben und mit H_2S zerlegt. Nach Entfernung der Pikrinsäure ergab die Prüfung eine 2,3fache Reinigung.



Bleiacetat. 2 g Pepsin in 20 ccm Wasser wurden mit 60 ccm gesättigter neutraler Bleiacetatlösung, die mit Essigsäure schwach angesäuert wurde, gefällt. Der Niederschlag, der 1,22 g betrug, wurde mit 0,2 %iger H_2SO_4 zerlegt. Die Reinigung war eine 2fache. Wurde die überschüssige Säure mit Baryt entfernt, so zeigte sich, daß Barytlauge das Pepsin fällt und inaktiviert.

Silberacetat. Dieses Reagenz lieferte nur in konzentrierter Lösung eine quantitative Fällung des Enzyms und eine 2fache Reinigung. Der erhaltene Niederschlag wurde auf zweifache Weise zerlegt. Erstens durch Bestimmen des Ag-Gehaltes (das Silberäquivalent wurde für andere Zwecke weiter unten angewandt) und Zusetzen eines Äquivalents an HCl, und zweitens durch Schwefelwasserstoff. Die Fällung des Pepsins mit einem Gemisch von Alkohol und Äther ergab im ersten Falle eine unvollständige Fällung, aber ein lösliches Präparat, im zweiten Falle eine unlösliches Präparat, das aber in Pulverform wirksam war.

Safranin. *Forbes* (l. c.) berichtet, daß es ihm gelungen ist, durch Fällung mit Safranin, Entfernung des Farbstoffs mit Iso-amylalkohol und 10 % Äther das Pepsin 21 mal gereinigt und in 65 % Ausbeute zu erhalten. Beim Nachprüfen dieser Arbeit fanden wir, daß die Entfernung des Farbstoffs in unserem Falle viele Stunden dauerte. In Anbetracht dessen war, wie wir über die Inaktivierung durch Schütteln und Verdünnung sagten, es nicht merkwürdig, daß unser Präparat nur sehr wenig aktiv war. Daß Safranin Pepsin quantitativ fällt, konnte aber bestätigt werden. 2 g Pepsin lieferte nach dem Entfernen des Farbstoffs und Fällen des Enzyms mit Alkohol und Äther 270 mg eines schwach wirksamen Präparates.

Naphtholgelb S (Flaviansäure). Dieses Reagenz liefert zwar einen Niederschlag, aber die ganze Wirksamkeit wurde in der Mutterlauge vorgefunden. Die Verbindung ist demnach löslich, und der entstandene Niederschlag adsorbiert kein Ferment.

Bariumacetat. 0,6 g Pepsin lieferten 40 mg eines inaktiven Niederschlags mit Gesamtwirkung in der Mutterlauge. Dieses Salz eignet sich demnach zur Entfernung der H_2SO_4, ohne das Ferment zu schädigen.

Alkohol. 1 g Pepsin wurde in 4 ccm Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt, so daß der Gehalt an Alkohol 80 % erreichte. Die Umfällung wurde 8 mal ausgeführt, so lange noch lösliches Material in den Alkohol überging. Zum Schluß wurde je einmal die Konzentration an Alkohol, 75-, 70- und 60 %ig gewählt. Alle alkoholischen Mutterlaugen waren inaktiv. Die Endausbeute war 261,5 mg, und die Prüfung ergab eine 5fache Reinigung.

Zusammenstellung der Resultate der Wirkung verschiedener Reagenzien auf das Pepsin.

Fällungsmittel	Fermentmenge angewandt in g	Ausbeute an Fällung in g	Wirksamkeit	Bemerkungen
Safranin	2,0	0,27	Schwach	Fällung vollständig aber inaktiviert
Pikrinsäure	2,0	—	Gut	Unvollständig
Silberpikrat . . .	1,0	0,545	2,2 mal besser als das Ausgangsm.	Vollständig
Bleipikrat	1,0	0,551	2,0	"
" verd. 1 : 2	0,2	0,074	3,1	"
" " 1 : 4				Unvollständig
Quecksilberpikrat .	0,2	0,0985	2,3	Vollständig
Bleiacetat neutr. .	2,0	1,22	2,0	"
Silberacetat	0,6	0,327	2,0	"
Naphtholgelb S . .	0,2	—	—	Kleiner inakt. Nd.
Bariumacetat . .	0,6	0,04	—	Nd. inakt., Mutterl. aktiv
Bariumpikrat . . .	10,0	0,348	—	Ebenso
Natriumpikrat . .	0,5	—	—	Kein Niederschlag
Alkohol 80—60% ig	1,0	0,2615	5,0	Vollständig

Fraktionierung des Pepsins.

Die Auffindung von löslichen Verbindungen des Pepsins führte uns zum partiellen Einengen der Lösungen und Fraktionierung des Enzyms. Die Leichtlöslichkeit der Ba- und Na-Salze des Pepsins scheint eine allgemeine Eigenschaft des Pepsins zu sein. Diese Eigenschaft ist vielleicht auf eine saure Gruppe im Pepsinmolekül zurückzuführen.

Fraktionierung mit Ba-Pikrat. 10 g Pepsin wurden mit einer gesättigten Lösung dieses Salzes versetzt. 348 mg eines inaktiven Niederschlags wurden abgetrennt und die Mutterlauge durch partielles Einengen im Vakuum fraktioniert. Die so erhaltene zweite Fraktion betrug 218 mg und erwies sich ebenfalls als inaktiv. Die dritte Fraktion wog 1,27 g und zeigte eine 4fache Reinigung. Die vierte (680 mg) und fünfte Fraktion, durch Einengen zur Trockne gewonnen (9,76 g), waren 3,8 mal weniger wirksam als das Augangsmaterial. Die einzelnen Fraktionen unterschieden sich voneinander in Farbe und Löslichkeit und ergaben, auf Bariumgehalt analysiert, fast denselben Gehalt, nämlich etwa 5%. Die inaktiven Fraktionen waren demnach nicht etwa Bariumpikrat. Wir ersehen aus diesem Versuch, daß durch fraktionierte Abscheidung wohl eine Trennung und Anreicherung des Enzyms stattfindet. Der große Aktivitätsverlust deutete schon darauf hin, daß das Enzym nicht eine einzige Substanz darstellt. Diese Vermutung wurde daraufhin an analogem Material geprüft.

Fraktionierung mit Ba-Acetat. 0,5 g Pepsin wurden mit einer Menge Ba-Acetat versetzt, die dem Ag-Gehalt des Pepsin-Ag-Acetatniederschlags entsprach. Der erste inaktive Niederschlag wurde abgetrennt und die Mutterlauge im Exsikkator langsam abgedunstet. Als ein zehnter Teil des ursprünglichen Volumens zurückblieb, wurde die erste Fraktion abgetrennt, die 50,6 mg wog und die Stärke des Ausgangsmaterials zeigte. Zur Mutterlauge wurde ein halbes Volumen von Alkohol hinzugesetzt. Die abgeschiedene zweite Fraktion (45 mg) zeigte fast gar keine Wirkung. Weiterer Zusatz von Alkohol ergab die dritte Fraktion (196 mg) von einer Stärke des Ausgangsmaterials. Die vierte Fraktion (36 mg) war inaktiv, während die fünfte, die ölförmig war (348 mg), wieder eine Spur von Aktivität zeigte. Diese Fraktionierung ergab somit auch ein merkwürdiges Verschwinden der Aktivität.

Fraktionierung mit Na-Pikrat. Versuch I: Zu 0,5 g Pepsin in 8 ccm Wasser wurden 0,48 g Natriumpikrat (Äquivalent von Ag in Ag-Acetatfällung) in 35 ccm Wasser zugesetzt. Es entstand zuerst keine Fällung. Die Lösung wurde daraufhin auf 15 ccm im Exsikkator eingeengt. Die erste Fällung (2 mg) war inaktiv. Zum Unterschied von anderen Pikraten wirken hier die Fällungen erst milchkoagulierend nach dem Zerlegen des Niederschlags. Die Mutterlauge wurde weiter auf 8 ccm eingedunstet. Die Abscheidung betrug jetzt 73,2 mg und wirkte nur äußerst schwach. Weiter eingeengt zu 4 ccm. Die jetzt erhaltene Fraktion (285 mg) besitzt wieder schwache Wirkung. Schließlich wurde der Rückstand zur Trockne eingeengt und wog 577,8 mg. Die Wirkung glich der des Ausgangsmaterials. Dieser größere Niederschlag, welcher mehr kristallinischen Charakter besaß, wurde durch Auslaugen mit 98 %igem Alkohol weiter zerlegt. Es wurden so wieder drei neue Fraktionen erhalten.

1. Alkoholisches Filtrat, das eingedampft 109 mg wog und inaktiv war.

2. Wasserlöslicher Teil des in Alkohol unlöslichen Rückstandes (426 mg), schwach wirksam, und

3. wasserunlöslicher Teil (35 mg), der nicht untersucht werden konnte. Beim weiteren Fraktionieren einer Fraktion, die die Stärke des Ausgangsmaterials besaß, wurde ein fast totaler Schwund der Aktivität konstatiert.

Versuch II: Um einen Überschuß von freiem Natriumpikrat zu vermeiden, wurde der Versuch dahin modifiziert, daß nur die Hälfte des Na-Pikrats zur Anwendung kam. Die Lösung wurde gleich zur Trockne eingeengt und der Rückstand mit Aceton erschöpft. In dieser Weise wurden zuerst zwei Fraktionen erhalten, nämlich eine acetonunlösliche, die 497 mg betrug, und eine acetonlösliche, die 240 mg wog. Die Prüfung der Fraktionen ergab, daß die erste die Aktivität des

Ausgangsmaterials zeigte, während die zweite total unwirksam war. Das Resultat war, daß trotz der Abtrennung von einem Drittel des inaktiven Materials die Aktivität der übrigen zwei Drittel nicht entsprechend in die Höhe ging. Daraufhin wurde die aktive Fraktion in einer minimalen Menge Wasser gelöst und von einem unlöslichen, dunkelbraunen Anteil (10,7 mg) abgetrennt. Zu der Mutterlauge wurden 11 ccm Aceton zugesetzt. Nach 24stündigem Stehenlassen wurde der Niederschlag (233 mg) abgeschleudert und die Mutterlauge wieder mit einem Überschuß von Aceton versetzt. Nach dem Abtrennen der Fällung (100 mg) wurde die letzte Mutterlauge zur Trockne verdampft (126 mg). Die Prüfung ergab, daß die erste Fraktion wie das ursprüngliche Pepsin wirkte. Die zweite war inaktiv und die dritte fast inaktiv. Also erhöhte sich auch hier trotz der Abtrennung von inaktiven Fraktionen die Aktivität nicht. Wir waren deshalb gezwungen, anzunehmen, daß das Pepsin keine einheitliche Substanz ist und mindestens aus zwei Substanzen besteht. In neu angelegten Versuchen schritten wir zur Kombination der Fraktionen.

Besteht das Pepsin wie das Trypsin aus inaktivem Ferment und Kinase?

Während verdünnte Ba- und Na-Pikratlösungen kein Pepsin niederschlagen, gelingt es, dies bei Anwendung von sehr konzentrierten Lösungen zu erreichen. In den neuen Versuchen wurden 0,25 g Pepsin nur in 1 ccm Wasser gelöst und dazu eine bei 35° gesättigte Na-Pikratlösung tropfenweise zugesetzt. Um einen Überschuß zu vermeiden, der sogar den schon entstandenen Niederschlag teilweise wieder auflöst, wurde die Fällung jedesmal abgeschleudert und mit dem Zutropfen nur so lange fortgefahren, solange noch ein neuer deutlicher Niederschlag entstand. In dieser Weise wurde ermittelt, daß 0,9 ccm der Na-Pikratlösung zur Fällung genügt. Nach längerem Stehenlassen wurde der Niederschlag (13 mg) abgetrennt. Durch peinliches Austitrieren wurde ermittelt, daß der Niederschlag in Mengen von 0,165 ccm auf Edestin wirkte, die Mutterlauge dagegen in Mengen von 0,115 ccm. Bei der Kombination der beiden zerlegten Fraktionen wurde ermittelt, daß beide schon in einer Menge von 0,055 ccm wirkten, also ein Drittel der ersten Fraktion und die Hälfte der zweiten Fraktion. Durch Vergleich der Stärke des Ausgangsmaterials wurde ausgerechnet, daß 13 mg Fällung wie 2,43 mg des Pepsins wirkten und 237 mg der Mutterlauge wie 132,0 mg des Pepsins. Die Gesamtaktivität beider Fraktionen entsprach 134,43 mg des Pepsins, somit fast 50 % Verlust der Aktivität. Die Kombination beider Fraktionen gleicht der Aktivität von 273,3 mg Pepsin. Das Pepsin wurde somit vollständig rekonstruiert. Der Befund von 23 mg mehr Pepsinaktivität liegt wahrscheinlich in der Fehler-

grenze der benutzten Bestimmungsmethoden oder ist auf Eliminierung von Hemmungsstoffen zurückzuführen. Wenn wir uns noch vor Augen führen, daß der Na-Pikratniederschlag so löslich ist, daß schon Berühren mit der Hand eine teilweise Lösung herbeiführt und daß der Niederschlag aus diesem Grunde nicht ausgewaschen werden durfte, so ist die erzielte Trennung eine recht gute. Es muß aber betont werden, daß die Fällung, die nur durch Auslaufen der Mutterlauge getrennt wurde, etwas von der Mutterlauge beibehielt, während die Mutterlauge selbstverständlich etwas von der Fällung gelöst enthalten mußte. Der Versuch wurde mit dem gleichen Resultat wiederholt.

Es muß betont werden, daß gleichzeitig mit den Edestinproben auch Milchproben angesetzt wurden. Wenn man die Dualität des Pepsins und Chymosins annimmt, ist es schwer zu begreifen, daß bei der Kombination der beiden Faktoren dasselbe optimale Verhältnis für beide Substrate besteht.

Versuche, das Pepsin und das inaktivierte Pepsin zu aktivieren. Die Gegenwart der Kinase in der Fällung vermutend, versuchten wir, eine gewöhnliche Pepsinlösung zu aktivieren. Eine Pepsinlösung, die in einer Menge von 0,065 ccm Edestin verdaute, wurde in verschiedenen Mengen mit 0,03 ccm des vermutlichen Aktivators versetzt. Die Aktivität wurde dann schon in 0,04 ccm des Pepsins gefunden. Bei der Berechnung der Verdauungskraft beider Zusätze wurde eine Aktivierung von über 20 % erhalten. Ob die geringe Aktivierung, die noch fast in der Fehlergrenze liegt, auf einen schon optimalen Gehalt des Aktivators im Pepsin selbst beruht oder darauf zurückzuführen ist, daß der Aktivator sich in der Mutterlauge und nicht in der Fällung befindet, wurde nicht ermittelt.

Im nächsten Versuch trachteten wir, ein Pepsin zu aktivieren, das durch Verdünnung fast unwirksam geworden ist. Eine Aktivierung konnte in diesem Falle nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden. Zu den obengenannten Einwänden kommt hier noch hinzu, daß das Enzym selbst hier die Wirksamkeit verlieren konnte.

Da das Pepsin zum Trypsin große Analogien zeigt, haben wir endlich versucht, ein durch Sodalösung inaktiviertes Pepsin mit Hilfe der Enterokinase in ein trypsinähnliches Enzym zu verwandeln. Die Versuche schlugen vorläufig fehl.

Zusammenfassung.

1. Das Pepsin läßt sich mit Schwierigkeit chemisch bearbeiten, weil seine wässerigen Lösungen durch allzu große Verdünnung, Bewegung, vielleicht auch teilweise durch Luftzufuhr, schnell inaktiviert werden. Manche Eingriffe, wie z. B. Einführen von Alkohol oder Aceton in



Gegenwart von Mineralsäuren, verwandeln das Pepsin in eine unlösliche Verbindung, aus welcher es nicht gelang, das Enzym wiederzugewinnen.

2. In Gegenwart von Pikrinsäure oder deren Salze wird das Pepsin stabiler und läßt sich leichter bearbeiten.

3. Durch eine Reihe von Reagenzien läßt sich das Pepsin, und zwar meistens nur in konzentrierter Lösung, quantitativ abscheiden.

4. Es kann nicht entschieden werden, ob die Fällungen echte Verbindungen oder nur Adsorptionserscheinungen sind. Die größere Stabilität, sowie der Umstand, daß manche Reagenzien nur total inaktive Fällungen erzeugen, sprechen für die erste Auffassung.

5. Die Löslichkeit der Ba- und Na-Salze, sowie die Unlöslichkeit der Salze der Schwermetalle, sprechen vielleicht für die Anwesenheit von sauren Gruppen im Pepsinmolekül.

6. In unseren Versuchen gingen stets die verdauende und die labende Wirkung einander parallel.

7. Durch die in der Arbeit angewandten Reagenzien wurde das Pepsin 2 bis 5mal gereinigt. Nach unseren Versuchen schien es voreilig, einen größeren Reinheitsgrad jetzt schon zu erstreben, weil durch Fraktionierung der in Wasser löslichen Verbindungen deutlich der Eindruck gewonnen wurde, daß das Pepsin, wie das Trypsin, aus inaktivem Ferment und Kinase besteht. In der Tat wurden zwei Fraktionen erhalten, die, obwohl von einer quantitativen Trennung nicht die Rede sein kann, einzeln genommen viel schwächer als in Kombination wirkten. Bei dem Vermischen beider Fraktionen ließ sich das Pepsin vollständig in der Wirkung regenerieren.

Literatur.

1) *Fenger Frederic* und *Robert H. Andrew*, Journ. of biol. Chem. **73**, 371, 1927. — 2) *H. R. Marston*, Biochem. Journ. **17**, 851, 1923. — 3) *J. C. Forbes*, Journ. of biol. Chem. **71**, 559, 1927. — 4) *Sophie Kolodziejska* und *Casimir Funk*, Chem. d. Zelle u. Gewebe **13**, 46, 1926; diese Zeitschr. **182**, 264, 1927. — 5) *Goulding*, *Borsook* und *Wasteneys*, Journ. Gen. Physiol. **10**, 451, 1927. — 6) *McMeekin* und *Koch*, Proc. Soc. Biol. Chem.; Journ. of biol. Chem. **67**, XIII, 1926. — 7) *McMeekin*, Thesis, University of Chicago, 1925. — 8) *French*, Proc. Soc. exper. Biol. Med. **23**, 765, 1926. — 9) *Casimir Funk* und *Albert Niemann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **61**, 263, 1910. — 10) *Fuld* und *Lewison*, diese Zeitschr. **6**, 473, 1907. — 11) *L. Michaelis* und *Rothstein*, ebendaselbst **105**, 60, 1920. — 12) *Casimir Funk*, ebendaselbst **191**, 181, 1927.

Intermediärer Kohlehydratstoffwechsel.

IV. Mitteilung:

Die Reaktionsformen des normalen Hundes bei intravenöser Dauerinjektion des Traubenzuckers[1].

Von

M. Wierzuchowski und H. Gadomska.

(Aus der Stoffwechselabteilung der Universität Warschau, zeitweise beim Institut für physiologische Chemie, Warschau.)

(Eingegangen am 18. Oktober 1927.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

1. Einleitung.

Bei der intravenösen Traubenzuckerinjektion hat die Forscher am meisten die Schwelle der „intravenösen Toleranz" und, im Zusammenhang damit, die Durchlässigkeit der Niere für Glykose, interessiert. Deshalb haben sie die Injektionsgeschwindigkeit oft gewechselt, um solche Bedingungen zu treffen, bei welchen der Traubenzucker in den Harn übergeht, und auf diese Weise die physiologische Konstante, wofür sie die intravenöse Toleranz für Glykose betrachtet haben, unter verschiedenen Bedingungen zu bestimmen. Unser Plan geht in ganz entgegengesetzter Richtung. Wir wollen den Tieren den Traubenzucker mit immer gleicher, konstanter Geschwindigkeit einführen, und während der Zuckerreiz sich immer gleich bleibt, werden wir die Verschiedenheit der Reaktion bei verschiedenen tierischen Individuen derselben Gattung zu finden suchen. Soviel uns bekannt ist, ist ein solcher Versuch in einem etwas größeren Maßstabe mit solcher Injektionsgeschwindigkeit und von solcher Injektionsdauer, wie wir hierbei angewandt haben, in der Literatur nicht zu finden.

---

[1] Die ersten Publikationen dieser Serie erschienen im Journ. of biol. Chem. **68**, 631; **73**, 417 und 445.

2. Technische Bemerkungen.

In allen Versuchen, die wir angestellt haben, wurde die Glykose mit der Geschwindigkeit von 2 g pro Kilogramm Körpergewicht und Stunde auf die schon beschriebene Weise injiziert [*Wierzuchowski* (1)], nämlich mit einer elektrisch getriebenen kleinen Spritze, die eine bestimmte Flüssigkeitsmenge, auf die sie eingestellt war, auf eine kontinuierliche Weise in die Vene einführte. Die eingespritzte Menge wurde fortwährend mittels einer kalibrierten Bürette kontrolliert und jede, selbst die leichteste Veränderung der Geschwindigkeit, wurde sofort ausgeglichen, so daß es uns leicht war, den Experimentalfehler der Injektion innerhalb von 1% während einer Zeit, die ohne Unterbrechung bis 17 Stunden dauerte, einzuhalten. Diese Genauigkeit stimmt also mit jener überein, welche im besten Falle die chemischen Methoden besitzen, die wir hier angewandt haben. Während mehrere Stunden dauernder Zuckerinfusionen kommt es zuweilen in späteren Phasen des Versuches vor, daß sich in der Vene, in welche die Injektionskanüle eingesteckt ist, eine Thrombose bildet, die einen starken Widerstand der eingespritzten Flüssigkeit entgegensetzt. Dieser besondere Umstand läßt sich sofort daran erkennen, daß sich die Ausflußgeschwindigkeit aus der Bürette vermindert, was übrigens sofort ausgeglichen werden kann. Der Druck aber innerhalb der Vene wird so stark, daß die eingespritzte Flüssigkeit durch die Wand der stark gedehnten Vene in die umgebenden Gewebe hineinzusickern beginnt und eine sich ständig vergrößernde Schwellung rings um die Kanüle bildet, mit dem Resultat, daß die Blut- und Harnzuckerkurven fallen, da weniger Zucker in die aktive Zirkulation eingeführt wird. Solche Versuche haben wir zurückgewiesen.

Als Glykosepräparat haben wir „Traubenzucker purum Merck“ verwendet. Seine Lösung war immer 20%ig, genau polarimetrisch bestimmt, auf mehrere Stunden vorher aus frisch bidestilliertem Wasser bereitet und zwecks Sterilisierung unmittelbar vor dem Versuch durch ein Berkefeldfilter durchgelassen. Diese Lösung, durch die Injektionsmaschine durchgeführt und aus der Kanüle fließend, hat sich immer analytisch als eine gewöhnliche α, β-Glykosemischung im Gleichgewicht gezeigt, und intravenös einem normalen Tiere eingeführt, hat sie nie toxische Erscheinungen hervorgerufen. Als Insulinpräparat haben wir das *Schering*sche in Pulverform in speziellen Ampullen (Chemische Fabrik auf Aktien, vorm. E. Schering), in welchen auch die Lösung des festen Präparates geschah, verwendet.

Als Versuchsobjekte haben wir normale Hündinnen verschiedener Rassen gewählt. Sie waren in Stoffwechselkäfigen untergebracht und mit immer gleichförmiger, gemischter Nahrung gefüttert, die genügend war, um die Tiere im Stoffwechselgleichgewicht zu erhalten. Körpergewicht wurde nach Harnablassen und Defäkation gemessen. Einem neuen Versuch wurde das Tier nur in dem Falle unterworfen, wenn es sich weiter ganz normal zeigte, obwohl es übrigens nicht immer dasselbe Gewicht wie vor dem vorhergehenden Versuch aufwies. Etwa 16 Stunden nach der letzten Fütterung wurde es, lose gebunden, auf einen Tisch gelegt, und nach 1½ bis 2 Stunden vollkommener Ruhe wurde ihm eine Blutprobe aus einer der oberflächlichen Venen ohne Stauung genommen. Nachher wurde mit Glykoseinjektion angefangen, während welcher von Zeit zu Zeit der Harn quantitativ stundenweise gesammelt und aus einer in Novokainanästhesie abpräparierten oberflächlichen Vene ungefähr in der Mitte der entsprechenden Stunde Blut ohne Stauung genommen wurde. Als Anti-

koagulans für das Blut wurde eine Mischung von Natriumfluorid und Kaliumoxalat verwendet. Das Verhalten der Tiere während der Versuche war meist einwandfrei.

Harnzucker wurde polarimetrisch bestimmt und mittels der *Bertrand*schen Methode kontrolliert, Blutzucker nach *Hagedorn-Jensen* (2). Für diese Methode haben wir uns eine eigene Tafel der Korrekturen angefertigt, die nur sehr wenig von den Angaben der Originalarbeit abwichen. Für die Bestimmung der Blutmilchsäure haben wir die bekannte Permanganatmethode angewandt.

Die Permanganatmethode ist, wie jede Milchsäurebestimmungsmethode, nicht für Milchsäure spezifisch und eine Reihe von Körpern wird durch sie mitbestimmt. Es scheint aber wenig wahrscheinlich, daß bei Zucker- oder Insulineinspritzung diese Körper eine größere Rolle beim Steigen der „Milchsäure"werte über den Ausgangspunkt spielen.

Der Begriff der assimilativen Geschwindigkeit. Mit der Glykose, die einem normalen Tier eingespritzt wird, kann folgendes geschehen:

1. Meistenteils wird sie assimiliert (Oxydation, Polymerisation usw.).

2. Teilweise bleibt sie als Glykose, in Stauung begriffen, in den Körpersäften und -geweben, erhöht den Blutzuckerspiegel und entzieht sich zeitweilig der Assimilation.

3. Ein Teil kann im Harn erscheinen, wenn 1. und 2. nicht ausreichen. Es folgt daraus, daß die Summe dieser drei Prozesse der Glykosemenge gleich sein muß, die in der entsprechenden Zeiteinheit eingeführt wird. Nennen wir die assimilative Geschwindigkeit für Glykose v_a, die Injektionsgeschwindigkeit v_i, die Exkretionsgeschwindigkeit v_e und die Stauungsgeschwindigkeit v_s, alle Werte in Gramm Glykose pro Stunde für das ganze Tier ausdrückend, so ist

$$v_i = v_a + v_e + v_s$$

und

$$v_a = v_i - v_e - v_s,$$

d. h. die assimilative Geschwindigkeit des ganzen Tieres für Glykose gleicht der Zufuhrgeschwindigkeit, vermindert um die gleichzeitig mit dem Harn entfernte Menge und diejenige Quantität, die unassimiliert im Körper staut. Auf Grund ausgedehnter Untersuchungen sagt *Palmer* (3): „Die Konzentration der Glykose in Geweben variiert direkt mit dem Grade der Hyperglykämie". Uns darauf stützend, vermögen wir die Geschwindigkeit der Glykosestauung aus der Differenz der Blutzuckermenge am Anfang und am Ende des fraglichen Zeitabschnittes annähernd zu berechnen. Dazu müssen wir aber zweierlei annehmen: 1. daß Blutglykose sich im Diffusionsgleichgewicht mit der Glykose in den Geweben befindet, und 2. daß 50% Körpergewicht Wasser ist. Wenn wir die Blutzuckermenge am Anfang der fraglichen

Periode c_1 und am Ende c_2 nennen, beide in Prozenten ausgedrückt, und W Körpergewicht in Kilogramm bedeutet, so ist

$$v_s = 10\,(c_2 - c_1) \cdot \frac{W}{2}\,^*.$$

Zwar ist das Blutplasma beim Hunde etwas zuckerreicher als die roten Blutkörperchen, aber dieser Unterschied ist zu unbedeutend, als daß man ihn in dieser sowieso approximativen Berechnung in Betracht ziehen müßte. Da v_i in unseren Versuchen immer 2 g pro Kilogramm und Stunde betrug, so ist

$$v_a = 2\,.\,W - v_e - 5\,(c_2 - c_1)\,.\,W.$$

Um die assimilative Geschwindigkeit bei Individuen verschiedenen Gewichtes vergleichen zu können, muß man sie pro Kilogramm Körpergewicht ausdrücken.

$$v_a \text{ pro kg} = 2 - \frac{v_e}{W} - 5\,(c_2 - c_1).$$

Wie aus dieser Formel ersichtlich ist, verringert sich die assimilative Geschwindigkeit, wenn 1. die Exkretionsgeschwindigkeit sich vergrößert, oder 2. der Blutzucker steigt, oder 3. beide Veränderungen zusammen vorkommen. Durch die Berechnung der assimilativen Geschwindigkeit bekommen wir eine Einsicht in die Totalität der Vorgänge, die in den Geweben bei der Traubenzuckerassimilation vorkommen. Der hier benutzte Begriff ist viel präziser als der der intravenösen Toleranz, da er sowohl die Zufuhrgeschwindigkeit der Glykose, als auch die Harn- und Blutzuckerveränderungen auf einmal berücksichtigt.

3. Resultate.

Wir haben zwei extreme Reaktionstypen isoliert.

A. Assimilative Reaktionsform. Hündin 7 (Spitz) wurde am nächsten Tage nach der Ankunft im Laboratorium einem Versuche unterworfen (Tabelle I). Die Menge der Harnglykose, pro Kilogramm Körpergewicht berechnet (v_e/W), betrug in der ersten Stunde 0,108 g, in den folgenden begann sie gewaltig zu sinken, so daß endlich in der sechsten Versuchsstunde im Harn keine Glykose mehr weder polarimetrisch, noch durch Reduktionsmethoden (*Fehling*) zu finden war. Der Blutzucker sank

* In einem Versuche *Palmers* (Hund Nr. 350), der als vollständig angesehen werden kann, beträgt die Glykosemenge im Körper, nach der Fütterung derselben, nach obiger Formel berechnet 7,50 g und *Palmers* Analysen gemäß 7,15 g (nach Ausschluß der hohen Werte in der Magendarmwand, die durch unmittelbare Resorption bedingt waren, und Ersetzung derselben durch solche Werte, die man bei intravenöser Glykoseinjektion findet). Der Unterschied ist also unbedeutend.



parallel von 235 mg-% bis auf 137 mg-%, woraus ersichtlich ist, daß das Nichterscheinen der Glykose im Harne nicht durch des „Nierenfilters“ Verdichtung für Glykose bedingt sein konnte. Dieselbe Form der Zuckerkurven tritt bei folgenden zwei Versuchen hervor (Tabelle II und III), die nach 11 und 35 Tagen Aufenthalt im Käfig ausgeführt wurden, aber immer größere Glykosemengen erscheinen im Harn, und eine immer größere Höhe erreicht die Blutzuckerkurve von der zweiten Versuchsstunde an. Diese Hündin, sowie auch andere hier benutzte Tiere waren (wie schon erwähnt) ganz normal, ihr Körper-

Tabelle I.

Hündin Nr. 7, Versuch 1. Rasse: Spitz. Körpergewicht 8,5 kg. Am Tage vorher ins Laboratorium eingeliefert und wie gewöhnlich vorbereitet. Assimilative zweiphasige Reaktionsform.

Periode	1. März 1927	Harn				Blut		Assimilative Geschwindigkeit pro kg u. Stde.
		Menge	Glykose			Zucker	Milchsäure	
			gefunden	pro kg	Reduktion (Fehl.)			
		ccm	g	g		mg-%	mg-%	g
	Nüchtern vor der Injektion		0		0	86	18,8	
I	1. Injektionsstunde . . .	26	0,92	0,108	+ +	235	27,6	1,15
	2. „ . . .	5	0,18	0,021	+			2,21
	3. „ . . .	10	0,03	0,004	0	144		2,23
II	4. „ . . .	7	0,03	0,004	0			2,01
	5. „ . . .	5	0,03	0,004	0	137		2,01
	6. „ . . .	150	0	0	0			2,00

Tabelle II.

Hündin Nr. 7, Versuch 2. Körpergewicht 8,5 kg. Assimilative zweiphasige Form 11 Tage nach der Ankunft im Laboratorium.

Periode	11. März 1927	Harn			Blut		Assimilative Geschwindigkeit pro kg u. Stde.
		Menge	Glykose		Zucker	Milchsäure	
			gefunden	pro kg			
		ccm	g	g	mg-%	mg-%	g
	Nüchtern vor der Injektion		0		78	8,2	
I	1. Injektionsstunde . . .	43	1,77	0,208	247	18,9	0,95
	2. „ . . .	24	0,62	0,073			2,02
	3. „ . . .	95	0,22	0,026	209	20,0	2,07
	4. „ . . .	72	0,90	0,106			2,00
II	5. „ . . .	15	0,10	0,012	165	18,3	2,10
	6. „ . . .	39	0,06	0,007			1,95
	7. „ . . .	30	0,11	0,013	182	24,1	1,97

Tabelle III.

Hündin Nr. 7, Versuch 3. Körpergewicht 8,2 kg. Assimilative zweiphasige Reaktionsform 35 Tage nach der Ankunft des Tieres im Laboratorium.

Periode	4. April 1927	Harn			Blut		Assimilative Geschwindigkeit pro kg u. Stde.
		Menge	Glykose		Zucker	Milchsäure	
			gefunden	pro kg			
		ccm	g	g	mg-%	mg-%	g
	Nüchtern vor der Injektion		0		73	15,7	
	1. Injektionsstunde . . .	24	1,90	0,232			0,95
I	2. „ . . .	20	1,91	0,233	237	24,4	1,77
	3. „ . . .	25	1,82	0,222			1,86
	4. „ . . .	8	0,78	0,095	206	24,4	1,98
II	5. „ . . .	25	0,67	0,082			1,93
	6. „ . . .	70	0,88	0,107	202		1,90

gewicht war während dieser Versuchsserie ziemlich konstant und außer den hier beschriebenen wurden in dieser Zeit keine anderen Versuche an diesem Tiere gemacht.

In diesem Reaktionstypus (assimilativ zweiphasig oder abfallend) kann man zwei Perioden unterscheiden:

in der ersten staut sich die Glykose in den Körpersäften und -geweben, die assimilative Geschwindigkeit ist klein, die Glykosurie ziemlich stark und der Blutzucker hoch,

in der zweiten vermindert sich die Zuckerstauung in Geweben, worauf das Sinken des Blutzuckers hinweist, die assimilative Geschwindigkeit steigt gewaltig, und in extremen Fällen scheint sie zeitweise die gleichzeitig injizierte Glykosemenge zu überschreiten, die Harnzuckermenge nähert sich dem Nullpunkte, um ihn zuweilen zu erreichen, Wenn endlich die Verhältnisse stabil werden, verarbeitet der Körper genau oder fast genau so viel Glykose, als ihm zugeführt wird, d. h. die bei dieser Injektionsgeschwindigkeit maximale Menge.

Je länger das Tier ein inaktives Leben in Laboratoriumsbedingungen führt, desto mehr verschlechtert sich seine assimilative Geschwindigkeit in den beiden Perioden. In der angegebenen Versuchsserie verlängert sich die erste Periode (Tabelle III), und die Zuckerkurven während derselben werden höher, in der zweiten steigen sie verhältnismäßig noch viel höher, als in der ersten. In verschiedenen Versuchsserien können beide Perioden individuell verschieden stark beeinflußt werden. Wie schnell die Veränderungen erfolgen können, zeigt folgende Zusammenstellung:

Hündin 7 Versuch Nr.	Zeit 1927	Das Tier verweilt im Laboratorium Tage	Glykose injiziert pro kg u. Stde. g	Glykose ausgeschieden pro kg u. Stde. g	Die ausgeschiedene Menge ist im Verhältnis zur injizierten %
1	1. III.	1	2,00	0,024	1,2
2	11. III.	11	2,00	0,072	3,6
3	4. IV.	35	2,00	0,162	8.1

Aus der totalen Menge von 12 Hunden, die wir für diese Arbeit untersucht haben, haben wir diesen Reaktionstypus in reiner Form außer dem obengenannten noch bei folgenden Tieren getroffen: Hündin 2 (Bulldogge, reiner Rasse), Hündin 6 (Spitz, Abb. 1) und bei Hündin 12 (Polizeihund, reiner Rasse, Tabelle IV). Da die Rasse hier ohne Einfluß war, sowie auch das Alter (es waren alles ausgewachsene Tiere) und die Diät (Hündin 2 bekam *Gr. Lusks* Basaldiät), da der Harnzucker, wenn er da war, als gewöhnliche α, β-Glykose im Gleichgewicht identifiziert wurde und in den betreffenden Versuchen nie Venenthrombose bemerkt wurde, müssen wir diese Reaktionsform im Gegensatz zu anderen als einen besonderen Reaktionstypus des Hundes im allgemeinen betrachten. Der Blutzucker bei diesen Tieren, im nüchternen Zustande bestimmt, zeigte keine besonderen Merkmale.

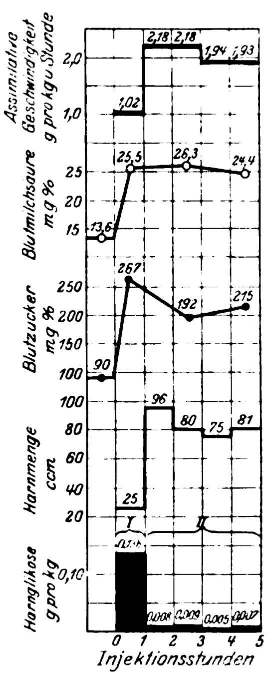


Abb. 1.
Hündin 6. Versuch 2. Körpergewicht 9,7 kg. Seit zwei Wochen im Laboratorium. Assimilativer zweiphasiger Reaktionstypus.

Eine gewisse Einsicht in den Mechanismus dieses zweiphasigen assimilativen Reaktionstypus gestattet sein Verhalten gegen Insulin, das vor dem Beginn der Glykoseinfusion eingespritzt wurde. Bei Hündin 12 haben wir die zweiphasige assimilative Form gefunden mit einer einige Stunden dauernden und nicht scharf abgegrenzten ersten Periode (Tabelle IV). In dem nächsten Versuche (Tabelle V) wurden diesem Hunde 100 Insulineinheiten subkutan eine Stunde vor dem Beginn der Glykoseinfusion gegeben. Der Erfolg ist klar. Die erste Periode der assimilativen Schwäche wurde durch das Insulin gänzlich aufgehoben, und beim Vergleich dieses Versuchs mit dem vorigen sehen wir, daß eigentlich der ganze zweite Versuch, besonders aber

Tabelle IV.

Hündin Nr. 12, Versuch 1. Rasse: Polizeihund. Körpergewicht 14,9 kg. Assimilative zweiphasige Reaktionsform. Das Tier seit 26 Tagen im Laboratorium.

Periode	2. Mai 1927	Harn			Blut		Assimilative Geschwindigkeit pro kg u. Stde.	Bemerkungen. Rektaltemperatur
		Menge	Glykose		Zucker	Milchsäure		
			gefunden	pro kg				
		ccm	g	g	mg-%	mg-%	g	°C
	Nüchtern vor der Injektion		0		82	15,0		
I	1. Injektionsstunde . .	20	1,44	0,097	223	17,1	1,20	39,5
	2. „ . .	144	3,47	0,233	286	26,1	1,45	
	3. „ . .	95	2,95	0,198			1,84	39,1
	4. „ . .	90	1,85	0,124	271	21,6	1,91	39,1
	5. „ . .	133	1,55	0,104			2,01	
		Durchschnitt:		0,151				
II	6. „ . .	82	0,97	0,065	226	22,2	2,05	
	7. „ . .	110	0,50	0,034			2,03	38,8
	8. „ . .	125	0,26	0,017	199	20,6	2,05	
	9. „ . .	95	0,49	0,033			1,98	38,8
	10. „ . .	120	0,38	0,026	194	23,0	1,99	
	11. „ . .	141	0,49	0,033			1,97	
		Durchschnitt:		0,035				

der Blutzuckerspiegel an die zweite Periode des ersten erinnert. Unter Insulineinfluß wurde die Harnzuckermenge, die während der 11 Stunden beim Hunde 12 ausgeschieden wurde, um 25 % vermindert, wobei nur in der ersten Periode eine Verminderung stattgefunden hat, während in der zweiten die Harnmenge eher gestiegen ist. Die Menge der Harnglykose betrug nämlich in Tabelle IV in den ersten 5 Stunden durchschnittlich 0,151 g/kg-Stunde, in den folgenden 6 Stunden 0,035 g, dagegen in Tabelle V betrug sie in den ersten 5 Stunden 0,062 g und in den nächsten 6 Stunden 0,069 g. Aus diesen zwei Versuchen ist es ersichtlich, daß die erste Periode nichts Unerschütterliches darstellt, sondern durch gewisse Faktoren beeinflußt und sogar aufgehoben werden kann. Insulin hat hier wahrscheinlich auf zweifache Weise gewirkt, erstens durch Erzeugung eines „Zuckervakuums", zweitens assimilativ stimulierend. Sehr wahrscheinlich scheint uns die Erklärung, daß die erste Periode des zweiphasigen assimilativen Typus dank einer gewissen Art „Überraschung" der Assimilationseinrichtungen durch den Überfluß des Zuckerreizes und deren vorübergehende Schwäche entsteht. Exogen eingeführtes Insulin hat diese Insuffizienz ausgeglichen.

Es ist aber nicht Regel, daß alle Tiere von stärkerer Glykoseavidität im ersten Moment der Glykoseeinspritzung eine assimilative

Tabelle V.

Hündin Nr. 12, Versuch 2. Körpergewicht 14,4 kg. Seit 33 Tagen im Laboratorium. Insulineinfluß auf die assimilative zweiphasige Form.

9. Mai 1927	Harn Menge ccm	Harn Glykose gefunden g	Harn Glykose pro kg g	Blut Zucker mg.%	Blut Milchsäure mg.%	Assimilative Geschwindigkeit pro kg u. Stde. g	Bemerkungen, Rektaltemperatur °C
Nüchtern vor der Injektion . .		0		80	16,4		
	100 Insulineinheiten subkutan						
Eine Stunde n. d. Insulininjektion				45			
1. Injektionsstunde *	11	0,50	0,035	176	26,7	1,31	38,9
2. „	10	0,87	0,060	198	29,3	1,88	
3. „	16	1,20	0,083			1,90	39,1
4. „	61	1,18	0,082	203	22,9	1,91	
5. „	29	0,70	0,049			1,98	39,0
	Durchschnitt:		0,062				
6. „	123	0,55	0,038	193	27,5	1,99	
7. „	165	0,74	0,051			1,91	
8. „	109	1,15	0,080	207	25,6	1,89	39,5
9. „	87	1,12	0,078			1,93	
10. „	125	1,42	0,099	204	22,2	1,91	39,2
11. „	106	1,01	0,070			1,93	39,0
	Durchschnitt:		0,069				

* Mit der Glykoseinfusion wurde 1 Stde. nach der Insulininjektion angefangen.

Tabelle VI.

Hündin Nr. 10, Versuch 1. Rasse: Spitz, Körpergewicht 10,7 kg. Seit 35 Tagen im Laboratorium. Assimilative platte Reaktion.

7. April 1927	Harn Menge ccm	Harn Glykose gefunden g	Harn Glykose pro kg g	Blut Zucker mg.%	Blut Milchsäure mg.%	Assimilative Geschwindigkeit pro kg u. Stde. g
Nüchtern vor der Injektion .		0		82	12,8	
1. Injektionsstunde	20	0,41	0,038	185	20,3	1,45
2. „		0,10	0,009			2,00
3. „	90	0,44	0,041	182	24.0	1,97
4. „	38	0,63	0,059			1,92
5. „	40	0,42	0,039	189	21,0	1,94
	Durchschnitt:		0,036			

Schwäche zeigen. Hündin 10 (Tabelle VI) zeigte ohne Insulininjektion keine erste Periode und hatte von Anfang an eine gleichmäßig niedrige Glykosurie und ebensolchen Blutzuckerspiegel mit starker assimilativer

Geschwindigkeit. Die injizierte Glykose fand bei diesem Tier die assimilativen Einrichtungen zur sofortigen vollen Reaktion bereit. Er war im allgemeinen ein sehr aktives Tier. Als Korrelat der steigenden subassimilativen Form, von welcher später die Rede sein wird, haben wir auch in der assimilativen Gruppe eine steigende Form, wenn auch nur in einem Versuche, gefunden.

Tabelle VII.

Hündin Nr. 3, Versuch 1. Rasse: Mischling. Körpergewicht 13,8 kg. Seit 30 Tagen im Laboratorium. Subassimilative ansteigende Form.

5. Februar 1927	Harn			Blut		Assimilative Geschwindigkeit pro kg u. Stde.
	Menge	Glykose		Zucker	Milchsäure	
		gefunden	pro kg			
	ccm	g	g	mg-%	mg-%	g
Nüchtern vor der Injektion		0		82	24,4	
1. Injektionsstunde	35	2,90	0,210			
2. "	35	2,90	0,210			
3. "	50	2,76	0,200	285	31,3	
4. "	50	2,76	0,200			1,81
5. "	148	3,77	0,269	283	24,2	1,74
6. "	148	3,77	0,269			1,70
7. "	127	4,36	0,316	297	29,2	1,65
8. "	127	4,36	0,316			

B. Subassimilative Reaktionsform. Gemeinsames Kennzeichen aller Versuche an den Tieren dieser Gruppe ist, im Gegensatz zum vorher beschriebenen Typus, eine verhältnismäßig beträchtliche Höhe der Harn- und Blutzuckerwerte bei intravenöser Glykoseinjektion. Dazu ist noch ein besonderes Merkmal bei allen Versuchen an der Hündin 3 der steigende Charakter der Harn- und zuweilen auch der Blutzuckerkurven (Tabelle VII bis IX, Abb. 2). Die Glykosurie in den Tabellen VII, VIII, IX und Abb. 2, vom ersten Moment recht bedeutend, vergrößert sich im Laufe des Versuchs, so daß sie schließlich in den Tafeln VIII, IX und Abb. 2 den Wert von etwa 25% der in derselben Zeit injizierten Glykosemenge erreicht. Wo der Blutzucker in der ersten Injektionsstunde bestimmt worden ist (Tabelle IX, Abb. 2), beträgt er 347 bis 365 mg-%, ist also um etwa 100 mg-% höher, als in den Versuchen auf Tabelle I bis III in der ersten Stunde. In den nächsten Stunden sinkt er entweder etwas unterhalb von 300 mg-% (Tabelle VII) oder überschreitet diese Zahl (Tabelle VIII, IX), ist also wieder etwa 100 mg-% höher als beim Hunde 7 während entsprechender Stunden. Es sei darauf hingewiesen, daß wir auch hier in der anfänglich größeren Höhe des Blutzuckers eine Spur von assimilativer Schwäche sehen

Tabelle VIII.

Hündin Nr. 3, Versuch 4. Körpergewicht 12,5 kg. Subassimilative ansteigende Form nach 58 Tagen Aufenthalt im Laboratorium.

4. März 1927	Harn			Blut	Assimilative Geschwindigkeit pro kg u. Stde.
	Menge	Glykose		Zucker	
		gefunden	pro kg		
	ccm	g	g	mg-%	g
Nüchtern vor der Injektion		0		91	
1. Injektionsstunde	80	2,58	0,206		
2. „	86	2,24	0,179	272	1,82
3. „	82	1,48	0,118		1,88
4. „	110	1,38	0,110	271	1,89
5. „	117	2,26	0,181	286	1,74
		100 Insulineinheiten subkutan			
6. „	95	3,12	0,250		1,65
7. „	107	4,54	0,363	330	1,54
8. „	110	5,58	0,446		1,43
9. „	110	6,25	0,500	379	1,38
10. „	106	6,30	0,504		1,47
11. „	111	6,66	0,533	390	1.44

Tabelle IX.

Hündin Nr. 3, Versuch 5. Körpergewicht 12,6 kg. Subassimilative ansteigende Form nach 63 Tagen Aufenthalt im Laboratorium.

9. März 1927	Harn			Blut		Assimilative Geschwindigkeit pro kg u. Stde.
	Menge	Glykose		Zucker	Milchsäure	
		gefunden	pro kg			
	ccm	g	g	mg-%	mg-%	g
Nüchtern vor der Injektion		0		80	11,7	
1. Injektionsstunde	53	2,61	0,207	347	13,2	0,46
2. „	104	4,73	0,375			1,77
3. „	75	3,56	0,283	291	31,4	1,86
4. „	113	3,31	0,263			1,72
5. „	126	3,42	0,271	297	31,8	1,71
6. „	129	5,48	0,435			1,45
7. „	125	6,39	0,507	342		1,38
8. „	84	4,76	0,378			

können. Die assimilative Geschwindigkeit ist sehr niedrig in der ersten Stunde, erhebt sich manchmal während einer Stunde bis 1,92 (Abb. 2) und fällt in den nächsten bis 1,70 (Tabelle VII), oder selbst bis 1,40 bis 1,50 (Tabelle VIII, IX, Abb. 2). Beim nüchternen Tiere hat der Blutzucker keine Abweichungen von der Norm gezeigt. Dieses Tier ist ziemlich langsam, nicht gefräßig gewesen, hat aber während der

halbjährigen Observation nicht das geringste Zeichen einer Abnormalität gezeigt und hat einer besonders langen Versuchsserie als Objekt gedient, im Mai und Juni innerhalb des Laboratoriums frei gelassen, hat es viel Aktivität gezeigt, was aber seine assimilativen Kräfte nicht beeinflußt hat. Die drei ersten Versuche zeigen (die in der folgenden Zusammenstellung angegebenen Zahlen beziehen sich nur auf die ersten 8 Stunden der entsprechenden Versuche) den Wert der Glykosurie von etwa 12 % der injizierten Menge, in den nächsten wird die Glykosurie um so größer, je länger das Tier im Laboratorium verweilt.

Hündin 3 Versuch Nr.	Zeit 1927	Das Tier verweilt im Laboratorium Tage	Glykose injiziert pro kg u. Stde. g	Glykose ausgeschieden pro kg u. Stde. g	Die ausgeschiedene Menge ist im Verhältnis zur injizierten %
1	5. II.	30	2,00	0,249	12,4
3	23. II.	49	2,00	0,245	12,3
4*	4. III.	58	2,00	0,232	11,6
5	9. III.	63	2,00	0,349	17,0
8*	8. VI.	154	2,00	0,380	19,0

* In diesen Versuchen wurde gegen Ende Insulin eingespritzt (während der letzten 3 Stunden der hier betrachteten 8 Stunden).

Wir haben diesem Tiere in Tabelle VIII und Abb. 2 Insulin in dem Moment eingespritzt, wo die Zuckerkurven ein Steigen zu zeigen begannen, im ersten Falle 100, im zweiten 300 Einheiten (jede 2 Stunden 100 Einheiten). In dem letzten Falle (Abb. 2) zeigte das Tier noch mehrere Stunden nachdem die Glykoseinfusion eingestellt war, typische Insulinreaktion, aus der es durch perorale Glykoseeinführung gerettet wurde. Es hatte also ohne jeden Zweifel einen Überschuß von Insulin im Körper. Nichtdestoweniger haben wir keinen Einfluß des Insulins auf die Zuckerassimilation beobachtet, in beiden Versuchen verlaufen die Zuckerkurven so, wie in den entsprechenden Kontrollversuchen ohne Insulin.

Wenn wir die Versuche, die in Abb. 1 und 2 dargestellt sind, als zwei extreme Reaktionstypen der normalen Hunde annehmen, den ersten am Tiere mit einer großen, den zweiten mit einer schwachen Assimilationskraft, so können wir zwischen diesen Reaktionen eine ganze Reihe von anderen aufstellen, die wir hier nur so weit erwähnen, als wir sie mehr als einmal beobachtet haben. Ziemlich oft findet man eine platte Reaktionsform, bei welcher die Zuckerkurven parallel zur Abszisse verlaufen. Von derselben Art, wie der Versuch auf Tabelle VI ist die Reaktion der Hündin 5 auf Tabelle X, aber das Niveau der Zuckerkurven steht hier viel höher (die Glykosurie ist 5 mal höher, und der Blutzucker etwa 100 mg-% höher als in Tabelle VI). Die platte Form kann also sowohl beim subassimilativen, wie auch beim assimilativen Typus vorkommen.

Auf der Tabelle XI ist ein Versuch dargestellt, der oft gefunden wird. Aus hohen Zuckerwerten sieht man, daß das Tier

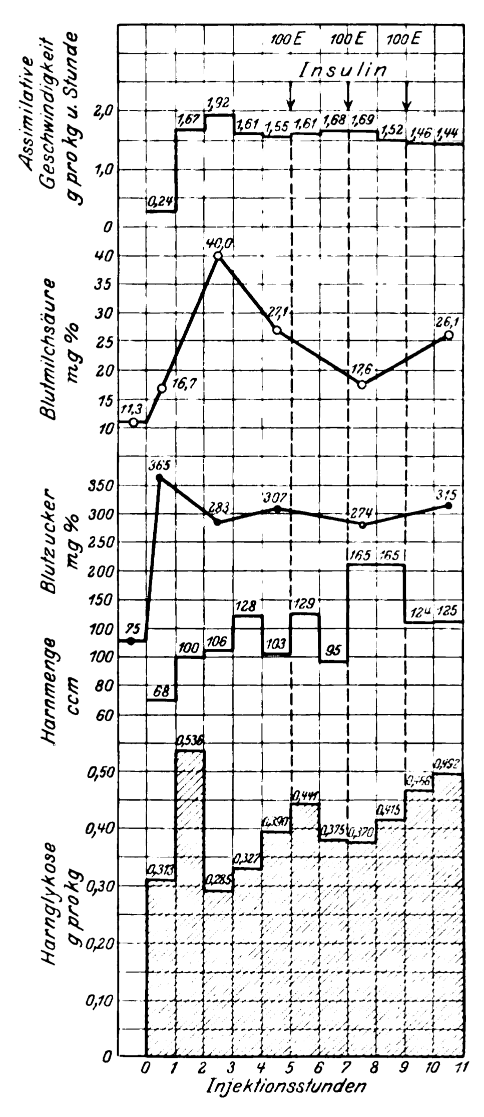


Abb. 2.
Hündin 3, Versuch 8. Körpergewicht 12,2 kg. 154 Tage nach der Ankunft im Laboratorium. Subassimilativer ansteigender Reaktionstypus.

subassimilativ reagiert. In der Form der Reaktion kann man aber zwei Perioden unterscheiden: die erste mit stärkerer Glykosurie und Glykämie, die zweite mit schwächerer. Der Insulineinfluß auf diese

Tabelle X.

Hündin Nr. 5, Versuch 1. Rasse: Spitz. Körpergewicht 11,7 kg. Subassimilative platte Reaktion beim Tiere, das sich seit 1½ Monaten im Laboratorium befindet.

13. Februar 1927	Harn			Blut		Assimilative Geschwindigkeit pro kg u. Stde
	Menge	Glykose		Zucker	Milchsäure	
		gefunden	pro kg			
	ccm	g	g	mg-%	mg-%	g
Nüchtern vor der Injektion		0		82	16,4	
1. Injektionsstunde	38	1,71	0,146			
2. „	38	1,71	0,146	283	40,6	
3. „			(0,168)*			
4. „			(0,168)*		40,8	
5. „	70	2,21	0,189			1,81
6. „	70	2,21	0,189	286	41,8	1,81
7. „	115	2,00	0,171			1,88
8. „	115	2,00	0,171	267	36,2	1,88

* Intrapoliert.

Tabelle XI.

Hündin Nr. 9, Versuch 3. Rasse: Mischling. Körpergewicht 16,7 kg. Seit 41 Tagen im Laboratorium. Subassimilative zweiphasige Reaktion.

Periode	4. Mai 1927	Harn			Blut		Assimilative Geschwindigkeit pro kg u. Stde.	Bemerkungen, Rektaltemperatur
		Menge	Glykose		Zucker	Milchsäure		
			gefunden	pro kg				
		ccm	g	g	mg-%	mg-%	g	°C
I	Nüchtern vor der Injektion		0		84	17,8		
	1. Injektionsstunde	96	4,29	0,257	319	23,8	0,57	
	2. „	145	7,28	0,436	297	26,2	1,45	
	3. „	136	5,37	0,322			1,71	38,9
	4. „	164	6,01	0,360	285	30,6	1,67	
	5. „	144	5,07	0,304			1,74	
	6. „	94	4,85	0,290	268	23,1	1,75	
		Durchschnitt:		0,328				
II	7. „	160	3,69	0,221			1,81	
	8. „	43	2,87	0,172	—	24,0	1,86	39,1
	9. „	185	3,73	0,223			1,81	
	10. „	125	2,85	0,171	239	22,8	1,86	
	11. „	170	3,70	0,222			1,81	
	12. „	120	2.92	0,175	250	26,1	1,85	38,9
		Durchschnitt:		0,196				

Form ist aus der Tabelle XII ersichtlich. Beide Perioden unterliegen einer Senkung ungefähr in demselben Verhältnis: während in Tabelle XI die Menge der Harnglykose in der ersten Versuchshälfte im Verhältnis zur zweiten 0,328 zu 0,196 g/kg-Stunde war, so war dasselbe Verhältnis

Tabelle XII.

Hündin Nr. 9, Versuch 4. Körpergewicht 17,0 kg. Seit 48 Tagen im Laboratorium. Einfluß des Insulins auf subassimilative zweiphasige Form.

Periode	11. Mai 1927	Harn			Blut		Assimilative Geschwindigkeit pro kg u. Stde.	Bemerkungen, Rektaltemperatur
		Menge	Glykose gefunden	Glykose pro kg	Zucker	Milchsäure		
		ccm	g	g	mg-%	mg-%	g	°C
	Nüchtern vor der Injektion		0		72	14,3		39,1
		100 Insulineinheiten subkutan						
	1 Stde. nach der Insulininjektion				47			
I	1. Injektionsstunde * . .	70	1,56	0,092	226	26,2	1,01	
I	2. " . .	195	3,84	0,231	248	26,9	1,66	38,8
I	3. " . .	197	4,26	0,251			1,73	
I	4. " . .	142	3,96	0,233	256	28,0	1,75	38,8
I	5. " . .	140	3,59	0,211			1,83	
I	6. " . .	135	2,77	0,163	240	22,8	1,88	
		Durchschnitt:		0,197				
II	7. " . .	125	2,50	0,147			1,86	39,1
II	8. " . .	120	2,67	0,157	236	18,6	1,85	
II	9. " . .	142	2,37	0,139			1,87	39,0
II	10. " . .	131	2,14	0,126	233	24,2	1,88	
II	11. " . .	140	2,02	0,119			1,85	39,1
II	12. " . .	130	1,83	0,108	245	23,4	1,86	
		Durchschnitt:		0,133				

* Mit der Glykoseinfusion wurde eine Stunde nach der Insulininjektion angefangen.

in Tabelle XII 0,197 zu 0,133. Ähnliche Senkung zeigt auch der Blutzucker. Die Menge der Harnglykose hat sich unter dem Insulineinfluß im Laufe von 12 Stunden um 37% vermindert, was nicht einer individuellen, von Insulinzufuhr unabhängigen Schwankung der Zuckerassimilation zugeschrieben werden kann, da dieselbe in Laboratoriumsverhältnissen eher eine Tendenz zur Verschlechterung als zur Verbesserung zeigt. In Tabelle XI haben wir die Glykose bei initialer Blutzuckermenge von 84 mg-% und in Tabelle XII bei 47 mg-% injiziert.

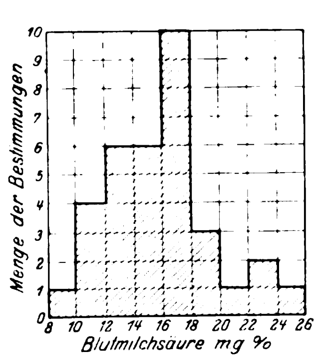


Abb. 3. Zusammenstellung der Blutmilchsäurewerte bei 12 normalen nüchternen Hunden (34 Bestimmungen).

Die Milchsäure im Blute.

Bei 12 normalen nüchternen Hunden haben wir in 34 Bestimmungen (Abb. 3) durchschnittlich den Wert der Blutmilchsäure von 15,7 mg-% gefunden.

Bei intravenöser Dauereinspritzung der Glykose hebt sich die Blutmilchsäuremenge bei allen Tieren und in allen Versuchen. Diese Erhöhung kann sehr verschieden sein, nicht nur bei verschiedenen Tieren, sondern selbst bei demselben Tiere in verschiedenen Versuchen. Die höchsten Punkte der Kurve erreichen den Wert zwischen 28 und 254 % Erhöhung über den Anfangswert. In absoluten Ziffern beträgt die Erhöhung ohne Narkose 6,0 bis 28,7 mg-%. Die Blutmilchsäure-

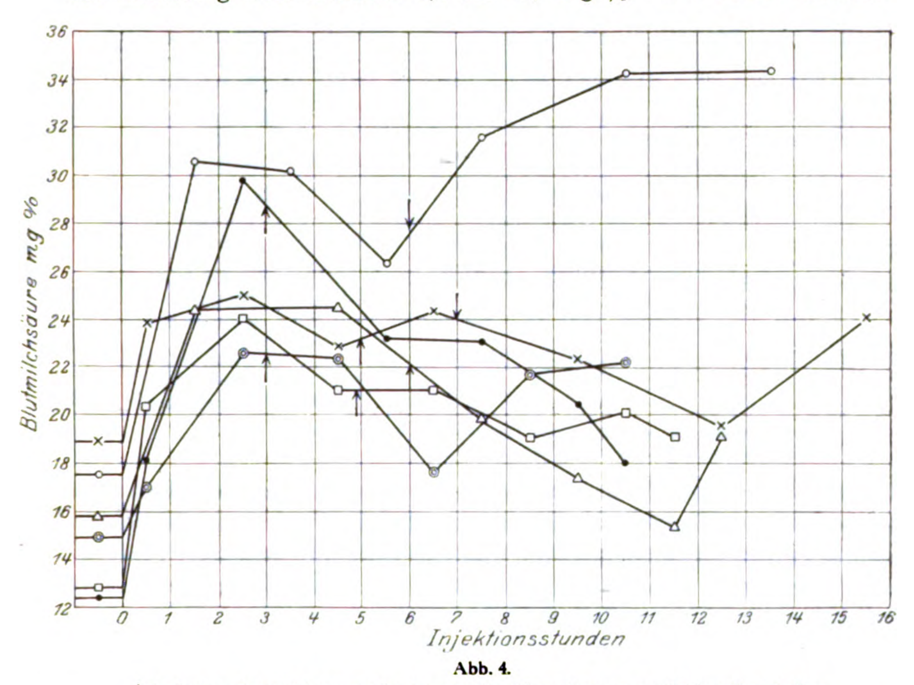


Abb. 4.

↓ bedeutet eine subkutane oder intravenöse Einspritzung von 100 Insulineinheiten. Blutmilchsäure *vor* und *nach* der Insulineinspritzung während der intravenösen Dauerinjektion des Traubenzuckers (vgl. Tabelle XIII).

—△—	Hündin 7,	Versuch	3
—●—	„ 7,	„	4
—○—	„ 8,	„	1
—×—	„ 8,	„	2
—□—	„ 10,	„	1
—◎—	„ 10,	„	2

kurve ist bei intravenöser Glykoseinfusion mit der hier angewandten Geschwindigkeit ziemlich charakteristisch, weil sie gewöhnlich (aber nicht immer) während der ersten Injektionsstunde nur wenige Milligrammprozent ansteigt und erst während der zweiten oder dritten Stunde den Gipfel erreicht, um in den folgenden entweder etwas zu sinken (Tabelle IV, VII, XI) oder sich ungefähr auf demselben Niveau zu halten (Abb. 1, Tabelle II, IX, X). Wir können in der Blutmilchsäure-

Tab[illegible]

Keine Summation des Einflusses der Insulin- und Traubenzuckereinspritzung a[illegible]

Versuch Nr.	Hündin	Datum 1927	Körpergewicht kg	Narkose		Anfangswerte
1	8**	17. III.	9,9	○	Blutmilchsäure	17.5
					Blutzucker	82
					Harnzucker	0
2	8**	24. III.	10,7	○	Blutmilchsäure	18.9
					Blutzucker	86
					Harnzucker	0
3	7	4. IV.	8,2	○	Blutmilchsäure	15.7
					Blutzucker	73
					Harnzucker	0
4	7	11. IV.	8,5	+	Blutmilchsäure	12,3
					Blutzucker	83
					Harnzucker	0
1	10	7. IV.	10,7	○	Blutmilchsäure	12.8
					Blutzucker	82
					Harnzucker	0
2	10	14. IV.	10,8	+	Blutmilchsäure	14.9
					Blutzucker	71
					Harnzucker	0

* Intravenöse oder subkutane Injektion von 100 Insulineinheiten.
** Das Tier war trächtig (erste Hälfte der Gravidität).

kurve keine besonderen Unterschiede zwischen assimilativen und subassimilativen Individuen finden. Aus Tabelle IV geht es klar hervor. daß trotz der Schwankungen, die während eines und desselben Versuchs die assimilative Geschwindigkeit zeigt, das einmal erreichte Blutmilchsäureniveau unverändert bleiben kann.

Wir wissen aus mehreren Untersuchungen, daß Insulin, einem normalen Tiere eingespritzt, meist den Milchsäurespiegel erhöht. Dagegen hat Insulin, einem normalen Tiere während der Glykoseinjektion eingespritzt, keinen Einfluß auf das schon erhöhte Blutmilchsäureniveau gehabt (Abb. 4, Tabelle XIII, es wurden in dieser Tabelle auch zwei Amytalnarkoseversuche angegeben). Diesen Versuchen können wir noch (aus den vorher protokollierten) den Versuch aus Abb. 2 anschließen.

Mit Ausnahme des Versuchs 1 auf Hündin 8 (Tabelle XIII), der eine gewisse Steigerung der Milchsäurewerte nach Insulininjektion zeigt (wofür wir keine Erklärung finden können, da die Hündin während des Versuchs sehr ruhig war), zeigen alle anderen Versuche, selbst der Versuch, der an demselben Tiere auf dieselbe Weise wiederholt wurde (Tabelle XIII, Hündin 8, Versuch 2) entweder einen geraden oder einen etwas abfallenden Verlauf der Milchsäurekurve, so als ob kein Insulin eingespritzt worden wäre (Abb. 4). Ein gemeinsames

III.

ie Blutmilchsäuremenge beim normalen Hunde ohne und während der Narkose.

Dauerinfusion des Traubenzuckers in Stunden															
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	30,5		30,1		26,3*		31,6			34,2			34,3		
	249		279		304		296			285			254		
0,72	0,77	0,63	1,50	1,99	1,90	1,63	1,50	1,31	1,07	0,71	0,76	0,95	1,14		
23,8		24,9		22,8*		24,3*			22,3			19,5			24,1
360		277		284		340			302			268			285
1,27	0,54	0,87	0,67	1,03	1,41	2,60	2,60	2,43	1,68	1,29	1,19	0,70	1,33	1,06	1,22
	24,4			24,4	*		19,8		17,3		15,3	19,1			
	237			206	202		183		164		168	142			
1,90	1,91	1,82	0,78	0,67	0,88	0,48	0,29	0,50	0,06	0,05	0	0			
18,1		29,8*			23,1		23,0		20,4	18,0					
376		288			212		239		203	195					
2,68	4,19	3,67	4,55	3,36	1,65	1,69	2,32	2,32	1,49	1,34					
20,3		24,0		21,0*		20,0		19,0		20,1	19,0				
185		182		189		162		179		179	204				
0,41	0,10	0,44	0,63	0,42	1,68	0,59	0,21	0,03	0,07	0,07	0,13				
17,0		22,6*		22,3		17,6		21,7		22,1					
368		262		198		174		184		193					
2,43	4,79	2,46	3,51	2,07	1,15	0,76	0,55	0,47	0,30	0,76					

Kennzeichen aller dieser Versuche scheint zu sein, daß hier die Glykoseassimilation nach Insulininjektion nicht deutlich oder nicht in solcher Weise steigt, daß man sie unzweideutig dem Insulin zuschreiben könnte. Zwar ist die Glykosurie bei Hündin 7 (Versuch 3) und Hündin 10 (Versuch 1) nach der Insulininjektion gesunken, aber diese beiden Tiere besaßen einen assimilativen Reaktionstypus. Bei Hündin 7 (Versuch 3) begann die Glykosurie schon vor der Insulininjektion zu sinken (vgl. Tabelle I bis III an demselben Tiere), die hohen anfänglichen Harnzuckerwerte wären als langdauernde erste Periode des zweiphasigen Typus aufzufassen. Bei Hündin 10 (Versuch 1) war die Reaktion von Anfang an assimilativ platt und der Blutzucker verblieb auch nach der Insulininjektion auf derselben Höhe, wie vor derselben. Es scheint uns deshalb, daß diese zwei Versuche in dem Sinne erklärt werden können, daß das eingespritzte Insulin in diesen zwei Fällen keine glykolytische Wirkung ausgeübt hat und die Herabsetzung der Glykosurie und eventuell des Blutzuckers endogenen Ursprungs sei. Die hier benutzte Insulindosis von 100 Einheiten war viel größer als notwendig war, um bei einem Tiere desselben Gewichtes im nüchternen Zustande die schwersten hypoglykämischen Krämpfe hervorzurufen, wie wir es oft zwecks Ausprobierung des *Scherings*chen Präparates versucht haben und was immer mit vollem Erfolge gelungen ist.

Wenn Insulin eine Stunde vor dem Beginn der Glykoseinfusion einverleibt wurde, so war während der ersten Infusionsstunde eine deutliche Summation des Einflusses auf die Blutmilchsäure infolge der Insulin- und Glykoseeinspritzung sichtbar. Die Zahlen während der ersten Stunde sind hier nämlich viel höher, als daß man diese Erhöhung ausschließlich der Glykoseinfusion zuschreiben könnte. Daß geht aus Tabelle V und XII im Vergleich mit Tabelle IV und XI hervor. In den nächsten Stunden waren die Milchsäurewerte von solcher Höhe, wie in den entsprechenden Experimenten ohne Insulin.

4. Besprechung.

Die individuelle Mannigfaltigkeit der Reaktion des normalen Hundes auf intravenöse Traubenzuckerinjektion mit konstanter Geschwindigkeit ist größer, als bisher angenommen war. Zum besonderen Studium haben wir extreme Reaktionen herangezogen, in der Meinung, daß bei diesen die Differenzen der Reaktion besonders ausdrucksvoll hervortreten werden und daß, wenn man erst Kenntnis der extremen Reaktionen besitzt, jede Übergangsform nichts Neues bringen wird. Obwohl unsere Klassifikation in assimilative und subassimilative Typen für extreme Fälle behalten werden kann, so wird man doch in der Praxis eine Menge von Übergangsformen finden (vgl. Tabelle XIII), die sich ohne besondere künstlich gestellte Grenze unmöglich in die eine oder die andere Gruppe werden eintragen lassen. Wenn wir die *gefundene durchschnittliche* (während mehrerer Stunden gemessene) *assimilative Höhe im allgemeinen im gegebenen Moment als etwas Konstantes* ansehen können, so erweist sich die *Form der Zuckerkurven* als nicht so konstant, obwohl sie *in extremen Typen relativ sehr konstant* gefunden werden kann. Solch konstantes Auftreten gewisser Reaktionsformen kann nicht etwas Zufälliges sein, sondern muß eine gewisse Feinheit des assimilativen Mechanismus repräsentieren. Um zu entscheiden, inwieweit diese assimilativen Feinheiten konstitutionell sind und inwieweit sie durch verschiedene Einflüsse modifiziert werden können, werden später weitere Untersuchungen angestellt. Wir haben die gegenwärtigen Versuche mit der Erwartung gemacht, daß bei einem gleichbleibenden Zuckerreize der Rhythmus der endogenen Insulinsekretion sich manifestieren wird, daß in einem etwas größeren Maßstabe das erscheinen wird, was bei jeder Nahrungszufuhr zustande kommt. Deshalb haben wir auch die Injektionsgeschwindigkeit der physiologischen Glykosezufuhrgeschwindigkeit vom Darm aus möglichst nahe gemacht. Besonders interessant war dieses Problem bei der Erklärung des Zustandekommens zweier diametral entgegengesetzten Assimilationsformen, nämlich des assimilativen abfallenden Typus, der eine ansteigende

Fähigkeit besitzt, und der subassimilativen anwachsenden Form, die eine progressive Schwäche in der Verarbeitung der Glykose aufweist. Wären diese Unterschiede dem Modus der endogenen Insulinproduktion oder einer anderen assimilativen Einrichtung zuzuschreiben? Zwecks Analyse haben wir bei diesen zwei Typen in dem Momente Insulin injiziert, wo die Zuckerkurven einen Aufschwung aufwiesen. Auf solche Weise konnten wir beweisen, daß Insulin imstande ist, die erste Periode des zweiphasigen assimilativen Typus zu beeinflussen, ja selbst aufzuheben, daß es aber absolut unfähig ist, die ansteigende Insuffizienz der subassimilativen anwachsenden Form im günstigen Sinne zu korrigieren.

Die Glykosurie schwankte in unseren Versuchen zwischen 1,2 und 19,0 % der injizierten Menge, und wenn nur spätere Versuchsstunden in Betracht gezogen werden, zwischen Null und 25 % der gleichzeitig injizierten Menge. Man sieht auf solche Weise, wie groß die Spannweite der Assimilationskräfte noch immer im Bereich des Normalen sein kann. Die höchsten pro Kilogramm und Stunde ausgeschiedenen Glykosemengen betragen 0,533 g, sind also mehreremal höher als diese, die man im Phlorrhizindiabetes beim hungernden Hunde findet [*Wierzuchowski* (4)], und welche durchschnittlich 0,130 g (zwischen 0,072 und 0,186 g pro Kilogramm und Stunde in 10 Versuchen) betrugen, also nahe der durchschnittlichen Glykosurie unserer Tiere (0,168 g) sind.

Den Einfluß der Inaktivität auf den Grundumsatz der Hunde haben *Lusk* und *Du Bois* (5) beschrieben. In ihren Versuchen ist der Grundumsatz eines aus der Freiheit in einen Käfig übergeführten Hundes langsam von 20 hinab zu 16,5 Cal pro Stunde gefallen. *Kunde* und *Nordlund* (6) haben, diese Beobachtung bestätigend, bei Hunden durch Beschränkung der Aktivität eine Erniedrigung des Grundumsatzes erzielt, eine Erhöhung hingegen durch Anregen der Muskelbewegungen. Unsere Versuche bilden von einem anderen Standpunkte aus eine Ergänzung der Beobachtungen der obengenannten Autoren. Die Existenz einer spontan herabfallenden zweiphasigen Reaktion erfordert besondere Vorsicht in der Beurteilung verschiedener glykolytisch wirkender Einflüsse, da das Herabfallen der Zuckerkurven endogenen Ursprungs sein könnte und dann nicht den angewandten Faktoren zuzuschreiben wäre.

Daß diese Arbeit zustandegekommen ist, verdanken wir den Herren Professoren *J. Modrakowski* und *W. Orłowski*. Herr Prof. *Przylecki* erwies uns im Institut für physiologische Chemie ein freundliches Entgegenkommen. Es ist uns eine Freude, diesen Herren hiermit unseren verbindlichsten Dank auszusprechen.



Für Insulin sind wir der Firma Chemische Fabrik auf Aktien, (vorm. E. Schering) zu Dank verpflichtet.

5. Zusammenfassung.

Bei intravenöser, mehrere Stunden währender Dauerinjektion der Glykose beim Hunde mit der Geschwindigkeit von 2 g Traubenzucker pro Kilogramm und Stunde lassen sich folgende Reaktionsarten unterscheiden:

A. Assimilative Reaktionsform von starker Glykoseavidität (Glykosurie der Null nahe, Blutzucker etwa 200 mg-% oder niedriger), welche sich folgendermaßen einteilen läßt:

1. zweiphasige (abfallende) Form mit einer ersten hohen und einer zweiten niedrigen Periode.
2. platte Form,
3. anwachsende Form, nur in einem Versuche bemerkt.

B. Subassimilative Reaktionsform von geringer Glykoseavidität (Glykosurie bis ungefähr 20% der injizierten Menge, Blutzucker etwa 300 mg-%) mit Unterabteilungen:

1. zweiphasige,
2. platte,
3. ansteigende Form.

Dabei beziehen sich die Ausdrücke „zweiphasig", „ansteigend" usw. auf die Form der Zuckerkurven während der Injektion. Zwischen diesen zwei extremen Typen gibt es die verschiedenartigsten Übergänge. Die Glykosurie schwankte in den verschiedenen Versuchen zwischen 1,2 und 19,0% der injizierten Menge (durchschnittlich 8,4%), der Blutzuckerdurchschnitt zwischen 172 und 319 mg-% (Minimum 137, Maximum 365).

Bei längerem Aufenthalt im Laboratorium läßt sich bei beiden Reaktionsformen, besonders aber bei der assimilativen, eine Verschlechterung der assimilativen Fähigkeit für Glykose bemerken.

Insulin vor dem Beginn der Zuckerinjektion einverleibt, hat die erste Periode der zweiphasigen assimilativen Form aufgehoben und im zweiphasigen subassimilativen Typus die Totalität der Zuckerkurven herabgesetzt. Dagegen während der Glykoseinjektion angewandt, hat es auf die subassimilative anwachsende Form sicher keinen und auf die anderen wahrscheinlich keinen Einfluß (vom Standpunkte dieser Forschungsmittel aus, die hier angewandt wurden) gehabt.

Im Blute eines nüchternen Hundes beträgt die Milchsäuremenge durchschnittlich 15,7 mg-%. Bei intravenöser Traubenzuckerinfusion wächst die Blutmilchsäuremenge in einer ziemlich charakteristischen

Kurve, welche sich bis zur zweiten eventuell dritten Stunde langsam erhöht und dann den Gipfel erreicht, was eine Erhöhung von 28 bis 254 % über den Anfangswert und in absoluten Ziffern 6,0 bis 28,7 mg-% bedeutet. Dann fällt entweder die Kurve etwas oder bleibt auf derselben Höhe. Es gibt keinen besonderen Unterschied in den Milchsäurewerten bei verschiedenen Assimilationstypen, auch wenn die assimilative Geschwindigkeit in einem und demselben Versuche stark schwankt, scheint das keinen Einfluß auf das einmal schon erreichte Milchsäureniveau zu haben. Nach Insulineinspritzung während der Glykoseinfusion zeigt die Blutmilchsäuremenge meist keine Veränderung. In diesen Versuchen hat Insulin keinen deutlichen Einfluß auf den Zuckerumsatz ausgeübt. Dagegen verbindet Insulin, vor der Glykoseinjektion angewandt, seinen Einfluß auf die Blutmilchsäure, mit dem der Glykoseinfusion aber nur in der ersten Injektionsstunde.

6. Literatur.

1) *M. Wierzuchowski*, Journ. of biol. Chem. **68**, 631, 1926. — 2) *H. C. Hagedorn* und *B. N. Jensen*, diese Zeitschr. **135**, 46, 1923. — 3) *W. W. Palmer*, Journ. of biol. Chem. **30**, 79, 1917. — 4) *M. Wierzuchowski*, ebendaselbst **73**, 417, 1927. — 5) *G. Lusk* and *E. F. Du Bois*, Journ. Physiol. **109**, 213, 1924. — 6) *M. M. Kunde* and *M. Nordlund*, Amer. Journ. Physiol. **180**, 681, 1927.

Die Fibrinogenmenge und ihr Verhältnis zur Labilität im Plasma.

Von

K. Samson.

(Aus der Serologischen Abteilung der Psychiatrischen Universitätsklinik und Staats-Krankenanstalt Hamburg-Friedrichsberg.)

(Eingegangen am 17. Oktober 1927.)

Eine einheitliche Ansicht über das Verhalten der Eiweißkörper im Serum bzw. Plasma ist trotz umfangreichster Arbeit heute noch nicht vorhanden. Während von einer Reihe Autoren auf den jeweiligen Zustand der Eiweißstoffe ein besonderer Wert gelegt wird, sind andere wieder der Ansicht, daß es sich bei unterschiedlichem Verhalten um differente Stoffe handeln muß, oder auch nur um Mengenunterschiede. Der besondere Zustand des Eiweißes soll sich im größeren Fällungsvermögen dartun und wird meist als erhöhte Labilität angesprochen. Vor allem soll dieser Zustand bei gesteigertem Gewebszerfall im Blut erkenntlich sein. Da die Eingriffe, die zur Feststellung vorgenommen wurden (Salzfällungen der verschiedensten Art, Säurefällungen, Alkohol- und Hitzewirkung) einen in keiner Weise einheitlichen Charakter tragen, die theoretischen Möglichkeiten auch nicht immer in sinnentsprechender Weise berücksichtigt wurden, scheinen erhebliche Fehlerquellen unterlaufen zu sein. Nun wären ja an sich, selbst bei falschen Vorstellungen und Theorien, diese letzteren nicht allzu schlecht zu bewerten, wenn nur, wie es ja auch häufig der Fall ist, klinisch verwendbare, gut und exakt immer wieder aufweisbare Phänomene auftreten. Aber die falschen Vorstellungen führen uns auf ein totes Geleise, so daß wir wohl die Bedeutung für einzelne Krankheiten, kaum aber den Sinn der Veränderungen im Gesamtsystem des Körpers erfassen können. Und gerade eine richtige Vorstellung von der Bedeutung der Veränderungsmöglichkeiten und dem Verhalten der Blutbestandteile muß uns willkommen sein, da sie allein zu neuen brauchbaren Versuchsanordnungen mit neuen Resultaten führt, die über Herkunft und Bedeutung der Bluteiweißkörper uns Auskunft geben können. Nur die Kenntnisse der physiologischen Bedeutung einer

Blutveränderung kann auf die Dauer neue Handhaben für die Klinik bringen, nie der Vergleich mit der Klinik allein. Diesem letzteren Vorgehen nämlich ist dadurch eine Grenze gezogen, daß es immer nur ein Symptom ohne näher bekannte Ursachen schafft, während die Kenntnis des physiologischen Vorganges jede dieser Erscheinungsformen viel weitgehender zu verwerten gestattet.

An Hand einiger Studien am *Fibrinogen* wollen wir hier den Weg zeigen, der sich uns vorerst als nötig gezeigt hat, um grundlegende Fragen zur Entscheidung zu bringen. Dabei leiten sich unsere Untersuchungen zunächst von denen einiger anderer ab. Um Veränderungen in der Zusammensetzung des Blutes zu studieren, wurde eine ganze Reihe von Methoden angegeben. Die nun schon seit bald 10 Jahren eingebürgerte Prüfung der Senkungsgeschwindigkeit wurde meist mit in den Kreis der hier näher zu erörternden Erscheinungen einbezogen. Es kann hier nicht der Ort sein, auf alle Deutungen dieses letzteren Phänomens einzugehen. Vor allem fand man eine Veränderung in sogenannten gröber dispersen Eiweißphasen des Plasmas: Fibrinogen und Globulin. Man brachte die elektrische Ladung der Eiweißfraktionen bzw. ihre entladende Wirkung auf die roten Blutkörperchen mit der Tendenz der letzteren mehr oder minder große Aggregate zu bilden zusammen. Diese Aggregate sinken schneller ab, denn die Senkung suspendierter Teilchen ist zum wesentlichen eine Funktion ihres Radius. Trotzdem muß als sicher gelten, daß die Verschiedenartigkeit der Eiweißkörper nicht allein das Phänomen bedingt, und daß sogar außer den Faktoren der Blutkörperchenmenge vielleicht auch Ionenverschiebungen in Betracht kommen. *F. Georgi* (3) deutet wenigstens einige Befunde bei der Epilepsie in dieser Weise. Andere Versuche, die Labilität des Plasmas oder Serums zu erweisen, sind von *Sachs* und von *Oettingen* (2) inauguriert worden, die bei der Flockung von Plasma mit Kochsalzlösung und Hitzewirkung Unterschiede feststellen konnten. Die Modifikation dieser Methode von *F. Georgi* (3) hat nach seinen Versuchen, die auch *Kafka* (4) bestätigen konnte, die Tatsache ergeben, daß Senkungsgeschwindigkeit und „Plasmalabilität" nicht immer parallel gehen. Außer dieser Methode haben wir noch diejenige von *Gerloczy* (1) in den Kreis unserer Untersuchungen einbezogen, zumal sie in letzter Zeit angewendet worden ist.

Das Fibrinogen ist ein amphoterer Eiweißkörper, der genau wie andere in Ionen zerfallende Stoffe der anorganischen Chemie (Säuren, Basen, Salze) durch die sogenannten sekundären Valenzen in Lösung gehalten wird, zu denen vor allem seine H- und OH-Gruppen gehören. Daneben besitzt dieser Körper, wie fast alle organischen Verbindungen, noch sogenannte ölige Gruppen (*Langmuir*), durch die seine einzelnen Moleküle zueinander eine gewisse Anziehungskraft haben. Neben seiner in bezug auf Löslichkeit absoluten Gleichheit mit den anderen Kristalloiden hat er als Besonderheit also diese Affinität einzelner seiner Moleküle zueinander, so daß er in Lösung immer mehr oder weniger viele Molekülaggregate bildet, außer daß seine Molekülgröße an sich schon gegenüber den Salzen der anorganischen Chemie erheblich ist.

Was seine elektrische Ladung anbetrifft, so ist sie genau von der gleichen Art wie die der anorganischen Ionen oder Molekel, Na^+, K^+, Cl^-, SO_4^{--}, nur ist sie, da es ein amphoterer Körper ist, bestimmt durch den jeweiligen Grad der H-Ionenkonzentration seiner Umgebung. Im sauren Gebiet hat das Fibrinogen positive Ladung, im alkalischen negative, der isoelektrische Punkt mit dem Ladungsminimum befindet sich nach *Wohlisch* bei p_H 4,85. Nun hängt die Löslichkeit des Fibrinogens aber nicht nur von seiner Ladung bzw. der damit verbundenen Ionisation ab, sondern diese Löslichkeit kann durch Salze auch im isoelektrischen Punkt erhöht werden, ohne daß damit das Fibrinogen eine vermehrte Ladung erhält (s. unten). Dies läßt sich unter verschiedensten Verhältnissen mit der sogenannten *Hofmeister*schen Ionenreihe an den verschiedensten Stoffen erweisen. Es sei noch erwähnt, daß unter den Verhältnissen des Plasmas ein solcher Stoff wie das Fibrinogen nur zum geringeren Teil mit Hilfe elektrischer Doppelschichten in Lösung gehalten wird.

Von den Eiweißkörpern des Serums scheint das Fibrinogen die größten Moleküle zu besitzen, hat aber gleichzeitig auch die größte Aggregatbildungstendenz. Schon oben wurde ausgeführt, daß die Labilität mit der Dispersität, d. h. der Größe der einzelnen Moleküle und Molekülaggregate zusammenhängen muß. Nun berichtet aber keine Arbeit darüber, ob nur die Molekülgröße allein unter den Dispersitätsbegriff fällt, oder auch nur die Größe der Aggregate, oder nur deren Menge, vielleicht auch alle diese Faktoren. Der Begriff der Labilität ist also ein komplexer, und eine Betrachtung der Bedingungen, unter denen eine Fällung (und damit Labilitätsprüfung) vorgenommen wird, kann uns wohl Einblick geben, welche Größe wir eigentlich bestimmen und welche Bedeutung diesen einzelnen Komponenten für etwaige Rückschlüsse auf das Geschehen im Organismus zukommt.

Wenn wir die Annahme vorwegnehmen, daß das Fibrinogen ein einheitlicher Körper ist, wozu neben älteren Analysen vor allem seine ganz besondere Beziehung zu dem Gerinnungsprozeß und sein sonstiges einheitliches Verhalten spricht, so müssen wir ihm auch eine konstante Molekulargröße zusprechen. Dann also erfassen die Labilitätsprüfungen entweder Menge oder Größe der Aggregate. Die Bedingungen, unter denen Aggregatbildungen bei Proteinen auftreten, sind sehr verschiedener Art. Als Hauptmoment kommt das Überwiegen der Affinität der einzelnen Moleküle zueinander gegenüber ihrer Affinität zum Lösungsmittel, hier dem Wasser, in Betracht. Und zwar dürfte, da die Anziehungskraft der Moleküle zueinander bei gleichem Stoff eine konstante Größe ist, die wechselnde Affinität zum Lösungsmittel die Hauptrolle spielen. Ionisation erhöht hierbei die Affinität zum Wasser und dadurch die Löslichkeit. Sie steigt einmal mit der Entfernung vom isoelektrischen

Punkt und ist andererseits durch die umgebenden Ionen bedingt, ohne daß aber irgendeine elektrische Ladungsänderung eintritt. Die Affinität zum Wasser wird schon durch sehr geringe Unterschiede der Salzkonzentration erhöht oder erniedrigt. Die verschiedenen Salze sind durchaus nach der Ionenart von verschiedenem Einfluß. Aggregate treten unter diesen Umständen bei durch Salzverminderung verringerten Löslichkeitsbedingungen auf. Im Plasma wird normaler oder verringerter Fibrinogengehalt wohl, da eine gewisse Ionenkonstanz herrscht, kaum eine erhöhte Aggregatbildung aufweisen, eher schon vermehrter Fibrinogengehalt, wenn eben Inkongruenz zwischen ihm und der Salzmenge herrscht. Da diese Inkongruenz sich steigert mit zunehmendem Fibrinogengehalt, wird dieser auch mehr Aggregate aufweisen. Es ist also anzunehmen, daß Menge und Aggregatbildung Hand in Hand gehen.

Betrachten wir zunächst die Methode der Labilitätsprüfung des Fibrinogens, die wir einer Untersuchung unterzogen haben, so sind es einmal die Fällungsmethode nach *F. Georgi* (3) mit Kochsalzlösung, des weiteren diejenige von *Gerloczy* (1) durch Erhitzen unter dem Einfluß verschiedener Salze. Bei der Fällung mit Kochsalz, die nach verschiedenen älteren Untersuchungen [s. *Kestner* (6)] quantitativ sein soll, handelt sich es um einen Aussalzungsprozeß, dessen Mechanismus nicht genau bekannt ist, in der anorganischen Chemie aber durchaus auch aufweisbar. Die Leichtigkeit der Fällung bei Verwendung verschiedener Salze hängt zum Teil sicher mit der Molekülgröße des zu fällenden Stoffes zusammen. Im übrigen fällen Sulfate prinzipiell viel leichter als Chloride und in viel geringeren Konzentrationen (die molare Konzentration als Grundlage genommen). Die relative Größe der Moleküle des Fibrinogens gestattet, es schon mit Chlorid, vor allem Kochsalz auszufällen, wenn auch hohe Konzentrationen (gesättigte Lösung zur vollkommenen Fällung) nötig werden. Beim Ammoniumsulfat genügen schon weit geringere Mengen. *F. Georgi* versetzt also 0,5 ccm Plasma, bzw. 0,4 bis 0,1 ccm, die mit physiologischer Kochsalzlösung auf 0,5 ccm aufgefüllt worden sind, mit 0,5 ccm 26 %iger (teilweise auch 30 %iger) Natriumchloridlösung und bestimmt dann die Stärke der Fällung und die Zeit, nach welcher sie eintritt. Molekülaggregate dürften unter diesen Bedingungen nicht leichter gefällt werden als einzelne Moleküle, konnte doch *Loeb* nachweisen, daß es bei der Gelatinelösung, die nahezu schon zum Gel erstarrt war, also viele Aggregate enthielt, gleich großer Mengen Salze zur Fällung bedurfte, wie bei einer nicht erstarrten Lösung, sofern nur deren Konzentration gleich war. *F. Georgi* benutzt, wie wir eben gesehen haben, eine Kochsalzlösung, die niemals die gesamte Fibrinogenmenge erfassen kann, vielmehr nur den Beginn einer Fällung. Fällbarkeit bei solch

niedriger Salzkonzentration wurde immer für ein bedeutsames Zeichen erhöhter Labilität angesprochen. Wie sich aber leicht erweisen läßt, ist diese Annahme sicher nicht völlig richtig.

Um dies zu zeigen, bedurfte es vor allem einer einfachen, aber doch brauchbaren Fibrinogenbestimmungsmethode. *Starlinger* und *Hartl* (7) haben die einzelnen Verfahren gegeneinander ausgewertet und sprechen dem gravimetrischen und Stickstoffbestimmungsverfahren die größte Genauigkeit zu. Bei der zwar einfachen Benutzung des Refraktometers kommt es wegen der Verschiedenartigkeit der spezifischen Refraktion des Fibrinogens in verschiedenen Fällen zu Differenzen gegenüber den beiden anderen Arbeitsweisen. Besonders auffallend ist diese Differenz bei Verwendung von Citratplasma, weniger bei Nativplasma (in paraffinierten Gefäßen aufgefangenes Plasma). Wenn wir trotzdem mit Citratplasma und der refraktometrischen Methode arbeiten, so geschah dies aus mehreren Gründen. Erstens ist es eine für Reihenuntersuchungen sehr praktische Methode. Weiter haben wir sie herangezogen, da wir einen Vergleich zur Senkungsgeschwindigkeit in unsere Betrachtungen miteinbeziehen wollten und dabei mit demselben Plasma arbeiten wollten, mit dem auch die Senkungsgeschwindigkeit gemessen war. Ebenso ist für uns auch bestimmend gewesen, daß der mögliche Fehler gegenüber der gravimetrischen oder der Stickstoffbestimmungsmethode durch unsere Arbeitsweise nach Möglichkeit vermieden wurde. Es wurden nämlich entweder sehr stark im Fibrinogengehalt differierende Plasmen in Arbeit genommen oder aber mit ein und demselben Plasma alle Parallelversuche vorgenommen, so daß nur das gegenseitige Verhältnis maßgebend war. In ein und derselben Probe blieb die spezifische Refraktion sicher immer gleich. Zuletzt aber bedienten wir uns des Refraktometers und der Hitzefällungen vor allem, weil sie am besten das Wesen der *Gerloczy*-Versuche (s. unten) zu deuten gestattete.

Bei der von *Starlinger* angegebenen Methode wird das Plasma 5 Minuten auf 56° im Wasserbad erwärmt, wobei alles Fibrinogen ausfallen soll. Bestimmt man vor und nach dem Erwärmen und Zentrifugieren die Brechungsindizes in der Flüssigkeit, so wird die Differenz dieser beiden Bestimmungen einen quantitativen Maßstab abgeben. Technisch ist hierzu zu bemerken, daß man im Gegensatz zu *Starlinger* die Gläschen mit einem Korken zum Schutze vor Verdampfung während des Erwärmens verschließen muß und nach dem Erhitzen und Abkühlen das am Glase haftende Kondenswasser wieder vor dem Zentrifugieren durch Umschwenken mit der Flüssigkeit vereinen muß. Unter diesen Bedingungen erhielten wir bei Doppelbestimmungen durchaus gleichsinnige Werte. Es bedarf etwa einer Menge von 0,5 bis 0,75 ccm Plasma. Die Methode stützt sich auf eine alte Feststellung von *Frédéricq* (6), daß bei 56° alles Fibrinogen quantitativ ausfällt, da dies der Gerinnungspunkt desselben ist.

Plasma wurde immer in der Weise gewonnen, daß zu 2,5 ccm einer 5% Natriumcitrat enthaltenden 0,9%igen Kochsalzlösung 7,5 ccm Blut aus einer Venenpunktion sofort hinzugefügt und gut umgeschüttelt wurde. Nach Zentrifugieren erhält man das leicht abhebbare Plasma.

Fibrinogenbestimmungen nach *Starlinger* ergaben in diesem Citratplasma zwischen 0,6 und 2,0 Skalenteilen Fibrinogen im *Pulfrich*schen Eintauchrefraktometer. Weiteres Verdünnen der Plasmamenge mit

0.9%iger Natriumcitratlösung ergab in zahlreichen Fällen einen der Verdünnung parallel gehenden Fibrinogengehalt, wie folgende Tabelle an einem Fall zeigen möge.

Plasma	1,55
Plasma-NaCl 1 : 2	0,75
Plasma-NaCl 3 : 4	1,10

Wurde die Verdünnung über die Hälfte hinaus vorgenommen, so war dieses quantitative Verhalten nur in denjenigen Fällen festzustellen, die einen hohen Fibrinogenausgangswert hatten. Bei normalem Fibrinogengehalt wurde bei höheren Verdünnungen weniger wiedergefunden, als der Rechnung entsprach, vermutlich weil in diesen Fällen ein Teil des Stoffes wohl denaturiert wird, aber wegen der Kleinheit der denaturierten Teilchen, da ihr einzelner Abstand sehr groß wird, in Suspension bleibt. Immerhin ließ dieses quantitative Verhalten schon darauf schließen, daß mit der Hitzefällung tatsächlich eine Fibrinogenbestimmung möglich ist und in ein und derselben Probe untereinander verwertbare Resultate liefert. Versuche, nach der Hitzefällung mit größeren Mengen gesättigter Kochsalzlösung noch etwa vorhandenes Fibrinogen zu fällen, hatten auch immer ein negatives Resultat. Wurde 20 Minuten erhitzt, statt der angegebenen 5 Minuten, erhielt man die gleichen Werte, ebenso wenn die Temperatur bis 60° erhöht wurde.

Nun verglichen wir diese Fibrinogenbestimmung mit einer solchen durch Versetzen mit gleichen Teilen gesättigter Kochsalzlösung.

Genau 0,5 ccm Plasma wurden mit 0,5 ccm gesättigter Kochsalzlösung in einem mit Gummistopfen vollkommen verschließbaren Gefäß versetzt, durch Schwenken gemischt und nach 3 Stunden zentrifugiert. In gleicher Weise wurden 0,5 ccm destillierten Wassers mit 0,5 ccm gesättigter Kochsalzlösung versehen. Bestimmt wurde dann der Refraktionsindex des Plasmas, der Plasmakochsalzlösung nach Zentrifugieren und der Wasserkochsalzlösung. Immer wurden Doppelversuche angesetzt; sie stimmten bis auf 0,05 Skalenteile genau überein.

Im folgenden sei eine Berechnung dieser Methode durchgeführt.

	Skalenteile		Refraktionsindex
Plasma-NaCl-Lösung	101,35	=	1,36512
Wasser-NaCl-Lösung	82,95	=	1,35856
			646
da zu gleichen Teilen verdünnt			× 2
Refraktionsanteile der Plasma-Eiweißkörper *nach* Fällung			**1292**
Plasma	51,5	=	1,34706
Wasser	15,0	=	1,33320
Refraktionsanteile *vor* Fällung			1386
„ *nach* „ (s. o.)			1292
Fibrinogengehalt			**94**

Nach *Starlinger* ergab sich folgendes:

	Skalenteile		Refraktionsindex
Plasma	51,5	=	1,34706
Plasma nach Erhitzen . . .	49,9	=	1,34683
Fibrinogengehalt	**0,6**	=	**23**

Der Labilitätsversuch nach *F. Georgi* war negativ; es handelt sich ja auch um einen Fall mit geringer Fibrinogenmenge. Wir ersehen aber aus dieser Gegenüberstellung, daß entweder nach *Starlinger* zu wenig ausfällt, oder aber beim Kochsalzfällungsversuch zuviel, denn alle untersuchten Fälle wiesen immer das gleiche Verhalten auf: etwa um 70 bis 80 Indexteile größere Werte bei der Kochsalzfällung als bei der Hitzefällung. Schon oben wurde erwähnt, daß nach Hitzefällung sich mit Kochsalz nichts mehr ausfällen läßt; hier müssen wir hinzufügen, daß trotz der scheinbar größeren Kochsalzfällung bei späterem Erhitzen noch eine deutliche Trübung entsteht. Diese Trübung ist in reinem Serum, das durch Spontangerinnung gewonnen war und mit Kochsalz versetzt wurde, nicht nachweisbar. Also trotz stärkerer Refraktionsabnahme tritt hier doch keine quantitative Fällung ein. Die Klärung dieses Phänomens haben wir bald gefunden. Wurde Serum mit der gleichen Menge Kochsalz versetzt, so entstand kein Ausfall, aber bei gleichartig durchgeführter Berechnung wie oben ergab sich eine Refraktionsabnahme von 40 bis 60 Indexteilen. Hieraus ergibt sich die bedeutsame Tatsache, daß beim Versetzen von Serum bzw. Plasmaeiweißlösung mit sehr konzentrierten Kochsalzlösungen der Refraktionsindex geändert wird. Diese Tatsache muß dazu führen, daß noch einmal die *Robertson*sche Methode zur Globulin-Albuminbestimmung in dieser Hinsicht genau durchgeprüft wird. Jedoch dürfte bei letzterer diesem Phänomen weniger Bedeutung zukommen, da als Resteiweiß bei dieser Albumin-Ammoniumsulfatgemische gemessen werden und Albuminlösungen kaum entquellungsfähige Aggregate enthalten dürften.

Von *Leendertz* ist eine andere Art der Fibrinogenbestimmung eingeführt worden: Mit paraffinierter Nadel in paraffiniertem Gefäß gewonnenes Plasma wurde nach Zentrifugieren mit paraffinierter Pipette abgehoben, zu 1,5 ccm dieses Plasmas alsdann 0,2 ccm einer 3,55 %igen Natriumcitratlösung hinzugesetzt und 0,04 ccm 1,5 %iges Calciumchlorid. Der Refraktometerindex wurde sofort bestimmt und nach einiger Zeit, wenn Gerinnung eingetreten war, nach Abzentrifugieren der geronnenen Masse. Hier also wird nicht die Hitzegerinnung, sondern die physiologische Spontangerinnung, ein ganz andersartiger Prozeß verwertet. Wenn diese beiden Bestimmungsarten übereinstimmen sollten, so mußte angenommen werden, daß sie beide rein quantitativ sind. Wir versetzten je 0,9 ccm unserer Plasmacitratmischung mit 0,1 ccm 5 %igen Calciumchlorids. Gerinnung trat nach etwa 45 Minuten bis zu 2 Stunden ein, je nach Menge des Fibrinogens (je mehr, desto schneller). Die Ausscheidung kann

beschleunigt werden durch einen Aufenthalt der Gläschen bei 37° im Brutschrank.

Die Werte, die man erhält, müssen im Vergleich zur *Starlinger*-Methode wegen der Verdünnung mit Calciumchlorid um 10% erhöht werden. Mit dieser Methode wurden durchaus gleichsinnige Resultate wie mit der *Starlinger*-Methode erhalten, allerdings fallen die Werte der *Leendertz*-Methode etwa 15 bis 20% geringer aus, wahrscheinlich, weil bei dieser letzteren das Fibrin in gequollenem Zustande ausgeschieden wird, wodurch der Restflüssigkeit Wasser entzogen und sie konzentrierter wird.

Plasma	1.	2.	3	4.	5.
Starlinger	1,05	1,45	0,6	1,8	0,7
Leendertz (+ 10%) . . .	0,99	1,37	0,55	1,65	0,6

Zwischen Salz und gelöstem Eiweiß herrscht bei den Aussalzungsvorgängen, wie sie *F. Georgi* benutzt, eine Konkurrenz um das Lösungsmittel, so daß sich nach dem Massenwirkungsgesetz ein Gleichgewicht zwischen Salz und Proteinkonzentration einstellen wird. Bei je einer bestimmten Salzkonzentration kann nur ein bestimmter Teil Eiweiß in Lösung bleiben; der Rest fällt aus. Nach dieser Vorstellung müßte also, wenn etwa 1% Fibrinogen in einer Lösung vorhanden ist, dieser Teil beim Versetzen der Lösung mit der gleichen Menge konzentrierter, etwa 35%iger Natriumchloridlösung fast vollkommen ausfallen, d. h. es gibt einen unter diesen Umständen maximalen Ausschlag. Fände der gleiche Versuch jedoch mit 30%iger Kochsalzlösung statt, so müßten etwa nur 0,8% ausfallen; es bliebe 0,2% in Lösung; bei Verwendung von 26%iger Kochsalzlösung bliebe angenommenerweise nur 0,5% in Lösung usw. Es kommt also nicht auf die ausfallenden Mengen an, sondern auf die in Lösung bleibenden. Versetze ich also eine Lösung, die 0,3% Fibrinogen enthält, mit der gleichen Menge 26%iger Kochsalzlösung, so träte keine Fällung ein, da bei dieser Salzkonzentration bis zu 0,5% Fibrinogen in Lösung bliebe; füge ich aber zu einer 0,7%igen Fibrinogenlösung in eben derselben Weise die Kochsalzlösung hinzu, so würde ein Ausfall von 0,2% Fibrin stattfinden. Die hier angegebenen Werte sind fiktive; wir konnten diesen Vorstellungen aber in qualitativer und quantitativer Weise eine Stütze verleihen. Qualitativ kann man dies insofern nachweisen, als, solange der Fibrinogengehalt unter 0,6 Skalenteilen bleibt, im *F. Georgi*-Versuch mit 26%iger Kochsalzlösung es niemals zur Ausflockung kommt. Über 0,7 Skalenteilen jedoch, genau entsprechend dem beobachteten Fibrinogengehalt. Quantitativ konnten wir unsere Behauptung insofern als richtig erweisen, als immer dann, wenn mit 26% oder konzentrierter Kochsalz-

lösung eine Fällung vorgenommen worden ist, beim späteren Erhitzen der Rest des Fibrinogens ausfällt, und zwar in immer gleicher Konzentration. Bei Verwendung gleicher Menge konzentrierter Kochsalzlösung bleibt immer derselbe Teil Fibrinogen noch in Lösung, nämlich 0,1 Skalenteil; bei 26%iger Kochsalzlösung stets 0,35 Skalenteile.

Nr.	Plasma	1	2	3	4
1a	0,5 Plasma + 0,5 26% NaCl $\overline{aa}$	91,4	90,55	91,05	89.5
2a	0,5 Plasma + 0,5 26% NaCl $\overline{aa}$ auf 56° erhitzt und zentrifugiert	91,05	90,2	90,7	89.15
	Differenz = Fibrinogengehalt in Lösung bei 26% NaCl . . .	0,35	0.35	0,35	0.35
1b	0,5 Plasma + 0,5 konz. NaCl $\overline{aa}$	100,9	99,7	100.55	99.6
2b	0,5 Plasma + 0,5 konz. NaCl $\overline{aa}$ auf 56° erhitzt und zentrifugiert	100,8	99,6	100,45	98,9
	Differenz = Fibrinogengehalt in Lösung bei konz. NaCl . .	0,1	0,1	0,1	0,1
	Fibrinogengehalt nach *Starlinger*	1,8	0,7	1,05	0,85

Die Tabelle, die vier solcher Versuche wiedergibt, soll dies veranschaulichen. Genau 0,5 ccm Plasma wurden einmal mit 0,5 ccm 26%iger Kochsalzlösung, einmal mit 0,5 ccm konzentrierter versetzt und nach 3 Stunden zentrifugiert. In der überstehenden Flüssigkeit wurde der Refraktometerindex bestimmt (Reihe 1a bzw. 1b), dann wurde 5 Minuten auf 56° erhitzt, wieder vom Niederschlag abzentrifugiert, abermals der Index bestimmt (Reihe 2a bzw. 2b) und die Differenz errechnet. Diese Differenz war immer gleich, sie beträgt beim Zusatz von 26%iger Kochsalzlösung 0,35 Skalenteile, beim Zusatz von konzentrierter Kochsalzlösung 0,1 Skalenteile.

Die Labilitätsbestimmung von *F. Georgi* beruht also zum größten Teil auf quantitativen Verhältnissen. Da wir nie bisher nachweisen konnten, daß bei einem bestimmten Salzgehalt der Lösung das eine Mal mehr, das andere Mal weniger Fibrinogen in Lösung bleibt, vielmehr immer die gleiche Menge, so ist auch dies ein Beweis für die Einheitlichkeit des Fibrinogens mit einheitlicher Molekülgröße. Da beim *F. Georgi*-Versuch neben der Stärke des Ausfalls vor allem der Zeitpunkt bestimmt wird, bei welchem zuerst sichtbare Flockung auftritt, so könnte dieser Zeitpunkt desto schneller auftreten, je mehr Molekülaggregate ursprünglich vorhanden waren. Das Auftreten der Flocken wird ja bestimmt durch den Zusammentritt von kleineren Komplexen zu

größeren sichtbaren, und wenn ursprünglich schon viele größere Komplexe vorhanden waren, so muß schon der Zusammentritt von wenigen derselben alsdann sehr früh deutlich sichtbare Flocken erzeugen. Tatsächlich haben wir bisher aber bei normalem Fibrinogengehalt oder leicht erhöhtem dieses nicht finden können, vielmehr scheint uns unter den Verhältnissen, die im Plasma herrschen, der Eintritt der Flockung zeitlich immer von der Menge des Fibrinogens abhängig zu sein. Es scheinen also nicht so große Ionenverschiebungen im Plasma vorhanden zu sein, daß eine auf diese Weise erkennbare Änderung der Zustandsform des Fibrinogens statthat.

Um die Labilität des Plasmas zu prüfen, hat *Gerloczy* (1) folgende Methode angegeben: Zu je 0,3 ccm Plasma-Citratmischung werden je 0,3 ccm folgender Salze in isotonischer Lösung, also etwa 1/6,9 mol. Konzentration zugesetzt: KSO_4, KCl, KBr, KNO_3, KJ, KSCN. Diese Salze entsprechen der *Hofmeister*schen Ionenreihe, die besagt, daß bei gleichem Kation (hier K) SO_4 stärker Eiweiß fällt als Cl, dies stärker als Br usw. Es wird steigend zwischen 50 und 60° im Wasserbad erhitzt und die Flockung in den Gläschen beobachtet und notiert.

Gerloczy geht von der Annahme aus, daß die Salze in der obigen Reihenfolge die Hitzegerinnung fördern bzw. unterstützen, so daß normale Seren keine Flockung zeigen, labile je nach dem Grade mit einem oder mehreren dieser Salze der Reihenfolge nach. Was zunächst die Ansicht betrifft, daß unter diesen Bedingungen SO_4 die Gerinnung mehr fördert als Cl usw., so ist sie mit Sicherheit falsch. Schon aus der *Starlinger*-Methode zur quantitativen Fibrinogenbestimmung, wie auch aus den Arbeiten *Frédéricq* geht einwandfrei hervor, daß ohne Salzzusatz bei 56° alles Fibrinogen ausfällt, und oben haben wir gezeigt, daß nach Verdünnen noch quantitativ alles Fibrinogen ausfällt. Die Salze der *Hofmeister*schen Reihe können also, da ohne ihren Zusatz bereits eine maximale Fällung eintritt, wenn erhitzt wird, die Gerinnung nicht fördern, sondern sie müssen sie in der umgekehrten Reihenfolge hindern, und SO_4 hemmt dabei fast gar nicht, SCN am stärksten. Wenn *Gerloczy* in Normalfällen mit SO_4 keine Flockung feststellen konnte, so stimmt das, eine Trübung wird aber unter den angegebenen Bedingungen immer eintreten. Diese Trübung ist sowohl im Agglutinoskop sichtbar als auch abzentrifugierbar. Zu einer gröberen Flockung kommt es erst, wenn der Fibrinogengehalt sehr hoch ist. Alsdann kommt es aber zu mehr oder minder starker Trübung oder Flockenbildung bei den übrigen Salzen, so daß immer ein Parallelismus zu der Fibrinogenmengenbestimmung da ist. Wenn nun diese Salze in der angegebenen Weise eine Hemmung auf die Gerinnung ausüben, was übrigens schon *Pauli* behauptet hat, so müßten hohe Konzentrationen dieser Salze stärker hemmen als niedrige, und eventuell müßte sich



sogar ein quantitatives Verhalten nachweisen. Beides zu zeigen, ist uns gelungen.

Je sechs Gläschen wurden mit 0,3 ccm folgender Salzkonzentrationen der obigen Anionenreihe beschickt: n/1, n/3,5, n/7 (isoton), n/14, n/28, n/64[1]. Hierzu kamen je 0,3 ccm Plasma, und es wurde 5 Minuten auf 56° erhitzt. Parallel wurde die Fibrinogenbestimmung nach *Starlinger* angesetzt und eine Kontrolle mit 0,3 Plasma + 0,3 destilliertem Wasser. Wir geben in folgenden der Raumersparnis halber nur zwei der immer gleich verlaufenen Versuche wieder.

Die Trübungen wurden gegeneinander makroskopisch abgeschätzt unter Zugrundelegung der Trübung in der Kontrolle. Die Bezeichnungen für den Ausfall waren der Reihe nach: O, Sp. Op. (Spur Opaleszenz), Op., St. Op. (starke Opaleszenz), Trbg. (Trübung), St. Trbg., +, ++, +++. Aus diesen Tabellen ist ersichtlich, daß die Trübungen bzw. Flockungen sich nach der Fibrinogenmenge richten (Fall 2 mehr als Fall 1) und weiter, daß, je höher die Konzentration der Salze ist, desto mehr Fibrinogen vor der Gerinnung geschützt wird, bei KSCN in den höchsten Konzentrationen sogar immer alles Fibrinogen an der Ausfällung gehindert wird. Sinkt der Salzzusatz unter die isotonische Konzentration, so ist der im Verhältnis zur Menge der Serumionen geringe Anteil der Zusatzionen von so minimalem Einfluß, daß keine deutlich hemmende Funktion mehr nachweisbar ist.

1. Fibrinogengehalt nach *Starlinger*: 0,6 Skalenteile. Kontrolle: +.

Konzentr.	n/1	n/3,5	n/7	n/14	n/28	n/56
Salz						
K_2SO_4	+/++	St. Trbg.	+	+	+	+
KCl	Trbg.	St. Trbg.	(+)	+	+	+
KBr	Op.	Trbg.	St. Trbg.	+	+	+
KNO_3	(Sp. Op.)	Sp. Op.	St. Trbg.	+	+	+
KJ	0	Op.	Trbg.	(+)	(+)	+
KSCN	0	0	Op.	St. Trbg.	(+)	+

2. Fibrinogengehalt nach *Starlinger*: 1,5 Skalenteile. Kontrolle: +++.

Konzentr.	n/1	n/3,5	n/7	n/14	n/28	n/56
Salz						
K_2SO_4	+++/++++	++/+++	+++	+++	+++	+++
KCl	++	++/+++	++/+++	+++	+++	+++
KBr	+	++	++/+++	++/+++	+++	+++
KNO_3	Trbg.	+	++	++/+++	+++	+++
KJ	0	Trbg.	+	++	++/+++	+++
KSCN	0	Op.	St. Trbg.	++	++/+++	+++

[1] Diese Mengen sind für n/1: K_2SO_4 8,713 auf 100 g Aqua dest.; KCl: 74,56 auf 100; Br: 11,902 auf 100; KNO_3: 10,11 auf 100; KJ: 16,602 auf 100; HSCN: 9,718 auf 100.

Von einem Plasma, das nach *Starlinger* 1,8 Skalenteile Fibrinogen enthielt, wurden Verdünnungen hergestellt in der Weise, daß in 5 Gläschen der Reihe nach 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 ccm Plasma kamen und mit physiologischer Kochsalzlösung auf 0,5 ccm aufgefüllt wurden. Dann kamen in jedes Gläschen 0,5 ccm n/3,5 KSCN. Es wurde 5 Minuten bei 56° erhitzt. Vor dem Erhitzen und nach dem Erhitzen und Zentrifugieren wurde die Refraktion bestimmt. Auf diese Weise wurde der fällbare Anteil des Fibrinogens nach dem Salzzusatz bestimmt. Wurde dieser fällbare Anteil von dem durch Errechnung feststellbaren tatsächlichen Fibrinogengehalt abgezogen, so erhält man den Fibrinogenwert, der durch 0,5 ccm n/3,5 KSCN in der Lösung vor der Gerinnung geschützt wird. Er beträgt, wie unsere Tabelle zeigt, innerhalb der Fehlergrenze gleichmäßig etwa 0,2 Skalenteile, also ist auch dieser Schutz mit größter Wahrscheinlichkeit auf einen quantitativen Prozeß zurückzuführen, zumal wir bei den anderen Salzen dasselbe, nur in weit geringerem Maße, feststellen konnten.

Plasma	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Fibrinogengehalt in der Verdünnung (errechnet)	0,9	0,72	0,54	0,36	0,18
Fibrinogenanteil, der gefällt wurde . . .	0,7	0,50	0,35	0,15	0,0
Differenz = in Lösung befindlicher Fibrinogengehalt bei n/3,5 KSCN	0,2	0,22	0,19	0,21	0,18

Bei diesem Prozeß handelt es sich um einen ganz anderen Mechanismus als bei dem im *F. Georgi*schen Versuch. Bei letzterem ist es ein reiner Aussalzungsprozeß, bei ersterem ein reiner Lösungsprozeß, der durch charakteristische Ioneneigentümlichkeiten bedingt ist. Er hat sicher nichts mit der elektrischen Ladung der Proteine zu tun, zumal ja in unseren Versuchen bei einem fast einheitlichen p_H von etwa 8,4 (elektromètrisch gemessen) das Fibrinogen immer negativ aufgeladen ist und zur Fällung das entgegengesetzt geladene Ion (also Kation K^+) von Einfluß sein müßte. Dieselben Versuche bei anderer Wasserstoffionenkonzentration zu prüfen, schlugen fehl, da alsdann sich die übrigen Eiweißkörper, insbesondere das Globulin an der Reaktion beteiligen.

Auch die Versuche von *Sachs* und von *Oettingen* (2) sind zum großen Teil auf die eben erläuterten Prinzipien zurückzuführen. Nach *Sachs* und *Oettingen* enthält stabiles Neugeborenenplasma sehr wenig Fibrinogen, während Gravidenplasma (labil) große Mengen dieses Stoffes aufweisen.

Weder mit der Methode von *F. Georgi*, noch mit der von *Gerloczy* läßt sich also eine reine Labilität nachweisen, vielmehr beruhen beide

zum überwiegenden Teil auf quantitativen Verhältnissen. Vielleicht kann beim *F. Georgi*-Versuch einmal durch einen begleitenden Ionenmangel es zu veränderter Fällbarkeit kommen. Wir haben bisher solche Fälle nicht auffinden können. Es wurde auch versucht, durch Viskositätsbestimmungen Unterschiede in dem Verhalten des Fibrinogens zu finden, ausgehend von der Annahme, daß bei gleichem Fibrinogengehalt höhere Teilchengröße eine relativ höhere Viskosität erzeugen müßte. Dies wurde in der Weise versucht, daß neben der Fibrinogenmengenbestimmung gleichfalls die Viskosität vor und nach dem Erhitzen gemessen wurde. Jedoch war der Vikositätsunterschied, der etwa 0,03 pro 0,1 Skalenteile Fibrinogen betrug (gemessen im *Heß*schen Viskosimeter) zu gering, um deutliche Unterschiede zu erhalten. Uns scheint also zunächst bei der Prüfung des Plasmas im Vergleich zur Senkungsreaktion der Mengenbestimmung des Fibrinogens die wichtigste Rolle zuzufallen. Ob allerdings eventuell der Vergleich der gravimetrischen oder einer ihr parallel gehenden Methoden mit der Bestimmung der spezifischen Refraktion noch neue Werte zu schaffen gestattet, bleibt zurzeit eine offene Frage.

Zusammenfassung.

1. Die Methoden der Fibrinogenbestimmung von *Starlinger* und *Leendertz* geben durchaus gleichsinnige Resultate, jedoch sind die Werte, die nach letzterer Methode gewonnen wurden, um 15 bis 20% geringer.

2. Beide müssen demnach unter den Voraussetzungen unserer Versuche als quantitative Methoden angesprochen werden.

3. In der Mehrzahl der Fälle besteht zwischen der Senkungsreaktion und der Fibrinogenmengenbestimmung ein Parallelismus. Dieser kommt am geringsten in den Fällen zum Ausdruck, in denen ein gering erhöhter Fibrinogengehalt herrscht.

4. Ein wichtiger zweiter Indikator für etwaige pathologische Prozesse dürfte also die Mengenbestimmung sein. Ein Vergleich zwischen Senkungsgeschwindigkeit und Fibrinogenmenge muß in den Fällen, in denen kein Parallelismus besteht, einer besonderen Beachtung wert sein. Die biologische Bedeutung dieses Phänomens ist vorab ebenso ungeklärt, wie die der Mengenvermehrung des Fibrinogens.

5. Der Begriff der Labilität der Eiweißkörper wird gar zu häufig ungenügend definiert verwendet. Es kann sich bei den Vorgängen, die seiner Aufstellung zugrunde liegen, ganz abgesehen von quantitativen Unterschieden um die Fragen a) der Molekülgröße, b) der Aggregatbildungstendenz, c) der Verschiedenartigkeit der elektrischen Ladung handeln.

6. Die Methode von *F. Georgi* zur Bestimmung der Plasmalabilität durch Aussalzen mittels 26%iger Kochsalzlösung und diejenige von *Gerloczy* durch Gerinnungshemmung nach Zusatz verschiedener Salze, haben zum großen Teil rein quantitative Vorgänge zur Grundlage, so daß immer der Parallelismus zur Fibrinogenmengenbestimmung deutlich ist.

7. Beide Reaktionen beruhen jedoch auf verschiedenen Mechanismen. Während die Methode von *F. Georgi* eine reiner Aussalzungsvorgang ist, beruht die Methode von *Gerloczy*, im Gegensatz zu dessen eigener Annahme, auf der Erhöhung der Lösungstendenz durch die Ionen der *Hofmeister*schen Reihe.

8. Refraktometrische Bestimmungen bei Aussalzung des Fibrinogens durch Kochsalzlösung sind nicht möglich.

Literatur.

1) *Gerloczy*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 43. — 2) *Sachs* und *Oettingen*, Münch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 12. — 3) *F. Georgi*, Klin. Wochenschr. 1925, Nr. 43, S. 2053. — 4) *Kafka*, Verh. d. Ges. Deutsch. Nervenärzte. Düsseldorf 1926. — 5) *Loeb*, Die Eiweißkörper. Berlin, Springer, 1924. — 6) *Kestner*, Chemie der Eiweißkörper. Braunschweig, Friedr. Vieweg & Sohn, 1926. — 7) *Starlinger* und *Hartl*, diese Zeitschr. **157**, 283, 1925.

Über den Fluorgehalt der Zähne[1].

Von

Fritz Trebitsch.

(Aus der Abteilung für Zahn- und Kieferersatz des Zahnärztlichen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 22. Oktober 1927.)

Im Jahre 1803 fand *Morichini*[2] das Fluor im fossilen Elfenbein. Unter anderen bestätigte *Gay-Lussac*[2] diese Angabe, der es auch in frischem Elfenbein und in den Zähnen von Menschen und Tieren nachwies.

Eine Auswahl der gefundenen Fluorwerte ist in der nachfolgenden Tabelle chronologisch zusammengestellt. Die große Zahl der vorliegenden Untersuchungen über diesen Gegenstand erklärt sich aus der bemerkenswerten Stellung, die das Fluor in der Chemie einnimmt; nicht zuletzt aber aus der Tatsache, daß Fluor in seinen löslichen Salzen ein starkes Antisepticum darstellt und daher seine Beziehungen zu den Zähnen besondere Beachtung fanden. Die aus der Tabelle ersichtlichen Schwankungen des Fluorwertes sind verhältnismäßig groß; sie erklären sich aus dem Wechsel des untersuchten Materials und aus den mannigfachen Methoden, über deren Vollkommenheit verschiedene Forscher mitunter recht verschieden urteilen.

Bezüglich der Entwicklung der Fluorfrage sei auf die Arbeit von *Gabriel* verwiesen. *Gabriel* selbst gibt an, daß der Fluorgehalt 0,05 % nicht übersteige, in seltenen Fällen könne er 0,1 % erreichen. Aber schon 1 Jahr später kam *Wrampelmeyer* zu anderen Ergebnissen und erhielt für gesunde und kranke Zähne von Kindern und Erwachsenen Werte von 0,65 bis 1,40 %; er spricht sich dahin aus, daß ein direkter Schluß auf die Gesundheit der Zähne aus ihrem Fluorgehalt nicht abzuleiten sei. *Gabriel* widersetzte sich diesen höheren Werten, und auch *Kühns* trat seiner Auffassung bei. *Michel* untersuchte nach Abtragung der Wurzeln nur die Kronen; er fand in normalen und kariösen Zähnen zwar keinen Unterschied des Fluor-

[1] Vortrag, gehalten auf dem Deutschen Zahnärztetag in Nürnberg am 6. September 1927.

[2] Zitiert nach *Gmelin-Meyer*.

Es fanden	Im Jahre	% Fluor	Methode	Anmerkungen **
Berzelius . . .	1807	1	Gew. Analyse	Knochen
Heintz	1849	1	" "	
Hoppe-Seyler .	1862	Spuren	Glasätzung	
Zaleski	1866	0,229	"	
*Hiller**	1885	5—8 (!)	Diff. Berechnung	Gänseknochen
*Weiske** . . .	1889	5 (!)	" "	Hühnerknochen
Brandl und *Tappeiner* . .	1891	Spuren	Destill. SiF_4	Knochen
*Carnot**. . . .	1892	0,1	" "	Elefantenzahn
*Gabriel**. . . .	1892	0,05	Glasätzung	Glycerinasche = Glühasche
Wrampelmeyer	1893	0,65—1,55	Destill. SiF_4	Ohne Belang für Caries
Kühns	1895	0,04	" "	
Michel	1897	0,56—0,69 in Zahnkronen	" "	Ohne Belang für Caries
Bertz	1898	Schmelz 1,171 Dentin 0,665	" "	
Hempel und *Scheffler** . .	1898	ges. 0,33—0,55 krank 0,19	Gasvolumetr.	Maßgeblich für Caries
*Harms** . . .	1899	0,006	Destill. SiF_4	Glycerinasche = Glühasche
*Jodlbauer** . .	1903	0,26—0,35	Gasvolumetr.	
Gassmann . . .	1908	θ	Gasvolumetr. Glasätzung	Statt F nur Cl
*Renner** . . .	1912	0,07—0,12	Gasvolumetr.	F + Cl!
Sonntag	1915	0,05—0,15	Glasätzung	Hundezähne
Gassmann . . .	1926	θ		

* % bezogen auf veraschte Substanz. — ** Wo nicht anders bemerkt: Menschenzähne.

gehalts, aber doch höhere Werte als *Gabriel*. 1898 wandte sich *Bertz* gegen *Gabriel* und bestimmte durchschnittlich 1,171 % Fluor im Zahnschmelz, 0,665 % im Zahnbein. Im selben Jahre traten auch *Hempel* und *Scheffler* mit ihren Befunden hervor. Sie hatten ihre eigene Methode der Gasvolumetrie angewandt, nach der sie in kranken Zähnen weniger Fluor bestimmten als in gesunden (0,1 gegen 0,33 %). *Harms* dagegen schienen selbst die von *Gabriel* angegebenen Fluorwerte zu groß. Nach *Jodlbauer* sind jedoch die Werte beider Autoren zu klein; er arbeitete nach der *Hempel*schen Methode und bestätigte ihre Zuverlässigkeit. 1908 erhielt auch *Gassmann* nach der *Hempel*schen Methode ähnliche Werte wie dieser; bei der qualitativen Untersuchung des Gases erwies es sich jedoch nicht als Fluor, sondern als Chlor; daraufhin verneinte er die Anwesenheit von Fluor überhaupt. *Renner* modifizierte die Methode nach *Hempel* und wies neben dem Chlor auch Fluor in Mengen von 0,07 bis 0,15 % nach. Zu ähnlichen Zahlen kam auch *Sonntag*, dessen Zusammenstellung der neueren Literatur hier hervorgehoben sei. *Gassmann* dagegen leugnete noch im Vorjahre das Vorhandensein von Fluor in den Zähnen und seine Anschauung hat auch in zahnärztliche Lehrbücher Aufnahme gefunden.

Da sich unter diesen Angaben kaum eine findet, die nicht im Widerspruch zu einer anderen stünde, erschien es notwendig, auf die Auswahl des Bestimmungsverfahrens besonderen Wert zu legen.

Die Methoden des Nachweises müssen von der veraschten Zahnsubstanz ausgehen, da die vorhandenen organischen Bestandteile den

Gang der Analyse stören. Nun hatte *Tammann* beobachtet, daß man bei der Veraschung organischer Substanzen mit einem Fluorverlust von 10 % selbst dann rechnen muß, wenn zur Veraschung die 60fache Menge Natriumcarbonat zugesetzt worden war. Später hat *Gabriel* die von ihm untersuchten Zähne und Knochen *nicht* dem Glühvorgang unterzogen. Er erhitzte sie 2 Stunden hindurch bei 200° in Glycerinkalilauge und glaubte, dadurch die organische Substanz ohne Veränderung des Rückstandes zu entziehen. Er erhielt auch bei der Untersuchung dieser *Glycerinasche*, wie er sie nennt, auf Fluor annähernd gleiche Ergebnisse, wie bei der von ihm gleichfalls angestellten Untersuchung der *Glühasche*; nämlich Hauchbilder (Glasätzung), aus denen er auf einen minimalen Fluorgehalt schloß. Nach ihm wurde das Verfahren der Glycerinveraschung noch von *Harms* benutzt.

Um die Brauchbarkeit dieser Methode klarzustellen, behandelte ich eine gewogene Menge Fluorcalcium genau nach *Gabriels* Vorschrift. Etwaigen aus den Gefäßen stammenden Fehlerquellen beugte ich vor, indem ich bei allen unter Temperaturerhöhung vorgenommenen Maßnahmen Platingefäße gebrauchte.

In eine Platinschale wurden 100 ccm Glycerin gebracht und darin 3,0 g reines KOH gelöst. In dieser Glycerinkalilauge wurden 0,20 g Calciumfluorid 2 Stunden hindurch bei 200° erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde filtriert und mit heißem Wasser nachgewaschen. Das Filtrat wurde in einer Platinschale eingedampft und verascht, die Asche in einen Platintiegel übertragen. Nach wiederholter Trocknung und Zusatz der etwa zehnfachen Menge von wasserfreiem Natriumcarbonat wurde über dem Teclubrenner geschmolzen (½ Stunde Vorwärmen, ½ Stunde Glühen). Die Schmelze wurde mit heißem Wasser aufgenommen und filtriert, im Filtrat nach dem weiter unten genannten Verfahren die Fluorbestimmung durchgeführt. Es wurden 0,00624 g Fluor gefunden, das sind 6,4 % des Fluors der Ausgangssubstanz.

Es gelang also, in dem nach Abscheidung der Glycerinasche erhaltenen Filtrat Fluor nachzuweisen, und zwar 6,4 % der Ausgangssubstanz. Damit erscheint es außer Zweifel, daß die nach diesem Veraschungsverfahren ermittelten Fluorwerte viel zu klein sein müssen. Die Ähnlichkeit der *Gabriel*schen Beobachtungen aus der Glycerin- und aus der Glühasche beruht offenbar darauf, daß sich die Fehlerquellen der Bestimmung die Wage halten. *Jodlbauer*, *Noetzel*, *Seemann* und *Treadwell* haben inzwischen festgestellt, daß die Glühverluste von Fluorcalcium verhältnismäßig unbedeutend sind, wenn das Glühen nur kurze Zeit und nicht vor dem Gebläse erfolgt. Ich glaubte daher, von einer Veraschung in den besonderen Apparaten von *Tucker* oder von *Wislicenus* Abstand nehmen zu können.

Zur Bestimmung des Fluors sind zahlreiche Methoden angegeben, die sich in fünf Gruppen zusammenfassen lassen:

1. Kolorimetrische Methoden,

2. titrimetrische Methoden,

3. gasanalytische Methoden,

4. Methoden, die auf der Austreibung von Siliciumtetrafluorid oder Fluorwasserstoff (Glasätzung) beruhen,

5. gewichtsanalytische Methoden.

Von einer kritischen Besprechung der verschiedenen Verfahren sei hier abgesehen und darüber auf die sehr gründlichen Arbeiten von *W. H. Adolph*, *Walter Schulz*, *Seemann* und *Renner* verwiesen. Für meine Zwecke erschien mir die Methode von *R. J. Meyer* und *W. Schulz* sehr geeignet, deren Verläßlichkeit auch von *Lühring*, *Noetzel* und *Ulex* hervorgehoben wird. Die Vorzüge der genannten Methode, nach der das Fluor mit Lanthanacetat als *Lanthanfluorid* bestimmt wird, sind nach *Walter Schulz* folgende:

1. Die Operationen können ohne Verlust in Glas- oder Porzellangefäßen vorgenommen werden. Man ist also auf die Benutzung des kostspieligen Platins nicht angewiesen.

2. Das Fluor kann aus *essigsaurer* Lösung gefällt werden, so daß das Mitfällen von Carbonaten und der Metallhydroxyde vermieden wird.

3. Es können sehr kleine Fluormengen quantitativ ausgefällt und genau bestimmt werden, da die Methode äußerst empfindlich und nicht mit den üblichen Fehlerquellen der anderen gravimetrischen Verfahren behaftet ist. Der Niederschlag wird unter den vorgeschriebenen Bedingungen weder durch Auswaschen noch durch überschüssige Fällungsmittel kolloid gelöst und ist vor allem unlöslich in Wasser und Essigsäure.

4. Günstig für die genaue Berechnung ist ferner das hohe Molekulargewicht des Niederschlages, in dem das Fluor nur ein Drittel des Gesamtgewichts ausmacht.

Zur Bestimmung nach einer gewichtsanalytischen Methode mußte die im Zahn enthaltene unlösliche Fluorverbindung in eine lösliche Form übergeführt werden. In der einschlägigen chemischen Literatur wird fast überall — ich nenne hier bloß *Rose*, *Hillebrand*, *Ruff*, *W. Schulz* — darauf hingewiesen, daß die Aufschlußschmelze mit Alkalicarbonat allein nicht genügt, sondern daß ein gewisser Zusatz von Kieselsäure notwendig ist. Nur bei *H. Dittrich* fand ich die Angabe, daß man zur Fluorbestimmung im Parisit, einem fluorhaltigen Carbonatmineral, die Aufschlußschmelze mit Alkalicarbonat allein durchführt. Versuchsweise wurde nun die gepulverte Trockensubstanz eines Zahnes geteilt und die Aufschlußschmelze einmal mit, einmal ohne Kieselsäure vor-

genommen. In jedem Schmelzgut wurde der Fluorgehalt gesondert bestimmt.

Zahn Nr. 65 (mittlerer oberer Schneidezahn) wurde gepulvert und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

0,3060 g dieser Trockensubstanz wurden nach dem weiter unten beschriebenen Verfahren untersucht und 0,4275 % Fluor gefunden.

0,3210 g derselben Trockensubstanz wurden mit der etwa zehnfachen Menge wasserfreien Natriumcarbonats und der etwa doppelten Menge mit Säure gereinigten und geglühten Quarzsandes im Platintiegel geschmolzen (½ Stunde geglüht). Der weitere Vorgang unterschied sich von dem unten beschriebenen Verfahren dadurch, daß vor der Abscheidung der Phosphorsäure nach *Treadwell* und *Koch* die Kieselsäure entfernt werden mußte. Dazu wurde die Lösung mehrmals mit Ammoniumcarbonat eingedampft und jedesmal nach Abstehen filtriert. Die restliche Kieselsäure wurde nach *Berzelius* mit ammoniakalischer Zinkoxydlösung ausgefällt. Es wurden 0,4017 % Fluor gefunden.

Es wurden fast gleiche Werte gefunden (0,402 und 0,428 %), und die Alkalicarbonatschmelze erschien somit für den Aufschluß in Zähnen ausreichend. Nach *Hillebrand* und *Adolph* muß die Schmelze mit dem unlöslichen Rückstand des ersten Aufschlusses ein zweites Mal wiederholt werden, um das gesamte Fluor in lösliches Alkalifluorid überzuführen. Ich schloß mich aber hier der Ansicht von *W. Schulz* an, daß durch die im Rückstand verbliebenen Mengen Fluor bei ihrer Geringfügigkeit kaum etwas am Resultat geändert worden wäre.

Die chemischen Untersuchungen wurden von mir im Hauptlaboratorium der *Chemischen Fabrik auf Actien* (vormals *E. Schering*) in Berlin durchgeführt. Es ist mir eine angenehme Pflicht, dem genannten Unternehmen für sein Entgegenkommen zu danken, besonders aber Herrn Direktor Professor *W. Schoeller*, sowie Herrn Dr. *M. Gehrke*.

Der Gang des Verfahrens gestaltete sich folgendermaßen: Die trocken aufbewahrten Zähne wurden mechanisch gereinigt, die Wurzeloberfläche vom Zementmantel annähernd befreit. Nach Reinigung mit Äther wurden die Zähne fein gepulvert und in der Trockenpistole über Phosphorpentoxyd bei Siedetemperatur des Toluols unter Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Trockensubstanz wurde mit der etwa 10fachen Menge wasserfreien Natriumcarbonats aufgeschlossen. Nach ausreichendem Vorwärmen auf kleiner Flamme wurde der bedeckte Platintiegel eine halbe Stunde über dem Teclubrenner der Rotglut ausgesetzt. Die erkaltete Schmelze wurde mit heißem Wasser aufgenommen, filtriert und mit heißem Wasser nachgewaschen. Da die Phosphorsäure nicht bestimmt werden sollte, war es nicht nötig, den von *Müller* und *Wagner* angegebenen Weg einzuschlagen. Vielmehr wurde nach *Treadwell* und *Koch* verfahren, das alkalische Filtrat mit Salpetersäure neutralisiert, die Phosphorsäure

mit Silbernitrat im Überschuß als Silberphosphat ausgefällt und dann abfiltriert. Der Silberüberschuß gelangte mit Natriumchloridlösung zur Abscheidung. Nun erwies es sich als notwendig, die durch das exakte Auswaschen der Filter stark vermehrte Flüssigkeitsmenge auf kleineres Volumen einzudampfen; zur Erzielung alkalischer Reaktion mußte dazu vorher ausreichend Natriumcarbonatlösung zugesetzt werden. Nach erfolgtem Abkühlen konnte jetzt die *Lanthan*-Methode nach *Meyer* und *Schulz* in Anwendung kommen. Sie wurde genau nach Vorschrift durchgeführt. Untersucht wurden bisher vier Zähne, bei denen sich ein Fluorgehalt von 0,29, 0,43, 0,55 und 0,59 %, bezogen auf die Trockensubstanz, herausstellte. Erwähnt sei hier, daß auch *W. Schulz* als Testobjekt für die *Lanthan*-Methode seinerzeit einen Zahn untersuchte und 0,48 % Fluor fand.

Aus der Verschiedenheit der gewonnenen Einzelergebnisse sind vorsichtigerweise vorerst keine Schlüsse zu ziehen, da sie auch durch verschiedenes Mengenverhältnis Schmelz : Dentin in den einzelnen Zähnen bedingt sein können. Jedoch dauern die Untersuchungen an und es soll darüber und auch über laufende Fütterungsversuche zu gegebener Zeit noch berichtet werden.

Daß sich Fluor in den Zähnen findet, geht auch noch aus anderen Beobachtungen der letzten Zeit hervor. So ist *R. Gross* auf Grund röntgenkristallographischer Untersuchungen zu dem Ergebnis gelangt, daß es sich bei den harten Zahngeweben um ein Haufwerk von Apatitkristallen handelt; und *Goldschmidt*[1] (Oslo) macht besonders darauf aufmerksam, daß sich im Zahnschmelz der härteste Apatit, nämlich Fluor-Apatit, vorfindet.

Meine vorläufigen Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Die Glycerinveraschung nach *Gabriel* ist für Fluorbestimmungen in Zähnen ungeeignet.

2. Zur Überführung der in Zähnen enthaltenen unlöslichen Fluoride in lösliche Verbindungen erscheint die Aufschlußschmelze mit Alkalicarbonat ohne Zusatz von Kieselsäure ausreichend.

3. In Menschenzähnen konnten nach der *Lanthan*-Methode von *Meyer* und *Schulz* Fluorwerte von 0,29 bis 0,59 %, bezogen auf Trockensubstanz, ermittelt werden.

Zu diesen Untersuchungen wurde ich von Herrn Professor *Schröder* angeregt, dem ich hierfür sowie für die stete Förderung während der Arbeit sehr zu Dank verpflichtet bin.

---

[1] Zitiert nach *V. Andresen*.

Literatur.

W. H. Adolph, Journ. of the Amer. Chem. Soc. **37**, 2500, 1915. — *Viggo Andresen*, Deutsch. Zähnärztl. Wochenschr. **30**, 126, 1927. — *F. Bertz*, Über die chemische Zusammensetzung der Zähne, Dissertation Würzburg 1898. — *Brandl* und *Tappeiner*, Zeitschr. f. Biol. **28**, 518, 1881. — *M. Dittrich*, C. Doelters Handb. d. Mineralchem. **1**, 522, 562. Dresden und Leipzig 1912. — *S. Gabriel*, Zeitschr. f. analyt. Chem. **31**, Heft 5, 1892; **33**, 53, 1894. — *Derselbe*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **18**, 257, 1893. — *Th. Gassmann*, ebendaselbst **55**, 455, 1908; **63**, 397, 1909. — *Derselbe*, Verh. d. V. Intern. Zahnärztl. Kongr. Berlin 1909, **1**, 365. — *Derselbe*, Schweiz. Vierteljahrsschrift f. Zahnheilkde. **20**, 204, 1910; **21**, 174, 1911; **22**, 201, 1912. — *Derselbe*, Leitfaden für die qualitative und quantitative chemische Analyse von Knochen und Zähnen. Bern 1926. — *Gmelin-Meyer*, Handb. d. anorg. Chem., 8. Aufl. Leipzig-Berlin 1926. System Nr. 5: Fluor. — *R. Gross*, Die kristalline Struktur von Dentin und Zahnschmelz in „Ziele und Wege der modernen Zahnheilkunde". Berlin 1926. — *H. Harms*, Beitrag zur Fluorfrage der Zahn- und Knochenaschen. Dissertation München 1899. — *W. Hempel* und *W. Scheffler*, Zeitschr. f. anorg. Chem. **20**, 1, 1899. — *W. F. Hillebrand*, Analyse der Silikat- und Carbonatgesteine. Deutsch von *E. Wilke-Dörfurt*. Leipzig 1910. — *F. Hoppe*, Virchows Arch. **24**, 13, 1862. — *Jodlbauer*, Zeitschr. f. Biol. **41**, 487, 1901; **44**, 259, 1908. — *C. Kühns*, Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung der harten Zahnsubstanzen des Menschen in verschiedenen Altersstufen. Dissertation Erlangen 1895. — *H. Lührig*, Pharmazeut. Zentralh. **67**, 465, 513, 531, 1926. — *R. J. Meyer* und *W. Schulz*, Zeitschr. f. angew. Chem. **38**, 203, 1925. — *A. Michel*, Deutsch. Monatsschr. f. Zahnheilkde. 1897, S. 332. — *E. Müller* und *W. Wagner*, Zeitschr. f. anorg. Chem. **129**, 306, 1923. — *O. Noetzel*, Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel **49**, 31, 204, 1925. — *O. Renner*, Über die Bestimmung des Fluors. Dissertation Dresden 1912. — *H. Rose*, Handb. d. analyt. Chem., 6. Aufl. Leipzig 1871. — *O. Ruff*, Die Chemie des Fluors. Berlin 1920. — *R. Schultz*, Korrespondenzbl. f. Zahnärzte 1888, S. 1. — *Walter Schulz*, Der Nachweis und die Bestimmung des Fluors. Dissertation Berlin 1920. — *F. Seemann*, Zeitschr. f. analyt. Chem. 1905, S. 343. — *G. Sonntag*, Arbeiten a. d. Kais. Gesundheitsamt **50**, 307, 1917. — *G. Tammann*, Zeitschr. f. analyt. Chem. **24**, 328, 1885. — *Treadwell* und *Koch*, ebendaselbst **43**, 469, 1904. — *G. M. Tucker*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **32**, 2583, 1899. — *H. Ulex*, Chem.-Ztg. **49**, 485, 1925. — *H. Wislicenus*, Zeitschr. f. analyt. Chem. **40**, 441, 1901. — *E. Wrampelmeyer*, ebendaselbst **32**, 550, 1893. — *E. Zdarek*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **69**, 127, 1910.

Oberflächenaktivität der Gallensäuren. I.

Von

N. A. Krajewsky und Nikolaus Wwedensky.

(Aus dem Laboratorium für experimentelle Biologie der Swerdlow-Universität und dem physiologischen Laboratorium der Krupsky-Akademie.)

(Eingegangen am 21. September 1927.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Die Gallensäuren und ihre Salze gehören zu den Stoffen, welche die Oberflächenspannung reinen Wassers stark herabsetzen.

Man bedient sich gegenwärtig dieser bekannten Eigenschaften derselben behufs qualitativer Bestimmung ihres Gehalts in pathologischen Flüssigkeiten, wie auch bisweilen zu dem Zwecke, um nach dem Depressionsgrad der Oberflächenspannung ihren relativen Gehalt in einer Lösung zu beurteilen.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Gallensäuren sind jedoch bis heute noch nicht genügend gründlich erforscht.

Zur Charakteristik der Oberflächeneigenschaften (Kapillaren) eines Stoffes dient auf Grund der heutigen physikalischen Arbeiten einerseits die Bestimmung der Adsorption (Γ) eines oberflächenaktiven Stoffes in der Oberflächenschicht (*Gibbs*[1]), andererseits seine Oberflächenaktivität (G), welche durch das Verhältnis der kleinen Differenz der Ordinaten der Oberflächenspannung ($\Delta \sigma$) zur Differenz der ihnen entsprechenden Abszissen der Konzentrationen (Δc), $\frac{\Delta \sigma}{\Delta c} = \frac{d \sigma}{d c} = G$ (*P. Rehbinder*[2]) gemessen wird.

Daneben können die Oberflächeneigenschaften eines Stoffes auch nach der Veränderung der Oberflächenspannung seiner Lösung mit der Temperatur (*P. Rehbinder*[3]) untersucht werden, analog dem, wie das bei reinen Flüssigkeiten der Fall war.

Außerdem lassen sich die Oberflächeneigenschaften auch nach der Veränderung der gesamten zur Bildung der Oberflächenschicht bei verschiedenen Temperaturen notwendigen Oberflächenenergie, $E = \sigma - T \frac{d \sigma}{d t}$,

[1] *Gibbs*, Thermodynamische Studien 1892.

[2] *P. Rehbinder*, Zeitschr. f. phys. Chem. **111**, 448, 1924; **121**, 103, 1926; s. auch diese Zeitschr. **187**, 19, 32, 1927.

[3] *Derselbe*, Zeitschr. f. phys. Chem. **111**, 447—464, 1924.

berechnen, d. h. nach der Veränderung von E mit der Temperatur (dE/dt) (*P. Rehbinder*[1]).

Für glykocholsaures Natrium hat *W. C. Mac Lewis* nur die Konzentrationskurve $[\sigma = f(c)]$ an der Grenze wässeriger Lösung/Petroläther untersucht. Die mangelhafte Kenntnis der Oberflächeneigenschaften (Kapillaren) von Gallensäuren erklärt sich offenbar durch die Schwierigkeiten, die bei den gewöhnlichen Untersuchungsmethoden (der stalagmometrischen und der kapillaren) unvermeidlich entstehen mußten.

Indem wir uns der von *Cantor*[2] vorgeschlagenen Maximalblasendruckmethode in der von *P. Rehbinder*[3] ausgearbeiteten Form bedienten, haben wir im Zusammenhang mit dem Gesamtproblem die Haupteigenschaften der Oberflächenschicht von glykochol- und taurocholsauren Natriumlösungen (von *Kahlbaum*) an der Grenze Lösung/Dampf (Luft) untersucht[4].

Die Oberflächenspannung glykocholsaurer Natriumlösungen ändert sich bei Konzentrationen von $c = 0{,}5$ Mol. linear, fast parallel $\sigma - t$ des Wassers, bei solchen von $c = 0{,}012$ Mol. jedoch ändert sie sich mit der Temperatur nach der für oberflächenaktive Stoffe charakteristischen Kurve, wobei der Temperaturkoeffizient $-d\sigma/dt$ von 0^0 C abnimmt.

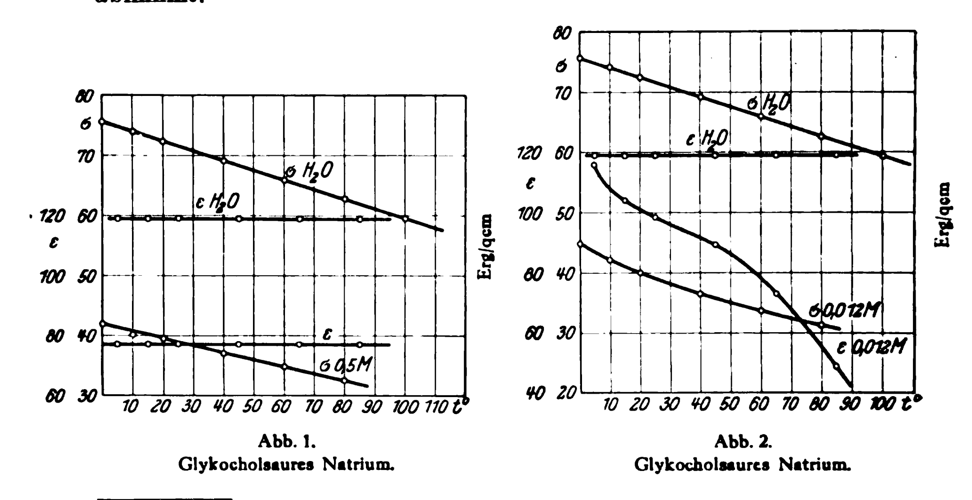


Abb. 1.
Glykocholsaures Natrium.

Abb. 2.
Glykocholsaures Natrium.

---

[1] *P. Rehbinder*, Journ. d. Russ. phys.-chem. Ges. **56**, 531, 1925; Journ. f. exper. Biol. u. Med., Nr. 14, S. 939, 1927.

[2] *M. Cantor*, Wied. Ann. **42**, 422, 1892.

[3] *P. Rehbinder*, Journ. f. exper. Biol. u. Med. **14**, 939, 1927; diese Zeitschr. **187**, 21, 1927.

[4] Wir drücken an dieser Stelle dem hochverehrten Herrn Prof. *M. O. Wichert* für die liebenswürdig zur Verfügung gestellten Gallensäurepräparate unseren aufrichtigen Dank aus.

Tabelle I.

Oberflächenspannung (in Erg) glykocholsauren Natriums bei verschiedenen Temperaturen.

	c_m	t	0,0	10,0	20,0	40,0	60,0	80,0	100,0
Reines Wasser .	—	$\sigma =$	75,9	74,2	72,75	69,45	66,10	62,82	59,60
Glykocholsaures Natrium	0,5 Mol.	$\sigma =$	42,2	40,8	39,8	37,0	34,5	32,5	—
	0,012 „	$\sigma =$	44,8	42,2	40,20	36,5	32,5	31,4	—

Tabelle II.

Temperaturkoeffizient glykocholsauren Natriums in Erg/qcm.

	c_m	t	5	15	25	45	65	85
Glykocholsaures Natrium	0,5 Mol.	$= \partial\sigma/\partial C$	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
	0,012 „	$= \partial\sigma/\partial C$	0,26	0,22	0,2	0,17	0,12	0,05

Dementsprechend ändert sich die gesamte Oberflächenenergie (E) einer glykocholsauren Natriumlösung mit der Temperatur nach einer typischen Kurve.

Tabelle III.

Gesamte Oberflächenenergie glykocholsauren Natriums in Erg/qcm.

	C	t	5	15	25	45	65	85
Glykocholsaures Natrium	0,012 Mol.	$E =$	115,78	104,36	98,6	89,56	73,26	47,90

Taurocholsaures wie auch glykocholsaures Natrium sind beides die Oberflächenspannung reinen Wassers stark herabsetzende Stoffe. Zum Unterschied von glykocholsaurem Natrium nimmt aber die Oberflächenspannung mit der Temperatur linear ab, jedoch mit einem bedeutend kleineren Temperaturkoeffizienten als bei reinem Wasser (entspricht 0,10 und 1,15 und ergibt konvergierende Geraden). Letzteres zeigt, daß das Maximum der Oberflächenaktivität bei ihrer Änderung mit der Temperatur links vom untersuchten Temperaturgebiet liegt.

Tabelle IV.

Oberflächenspannung einer taurocholsauren Natriumlösung bei verschiedenen Temperaturen in Erg/qcm.

	c_m	t	0,0	10,0	20,0	40,0	60,0	80,0	100,0
Reines Wasser .	—	$\sigma =$	75,9	74,2	72,75	69,45	66,10	68,82	59,60
Taurocholsaures Natrium	0,5 Mol.	$\sigma =$	44,2	43,2	42,5	40,5	38,8	37,5	—
	0,09 „	$\sigma =$	45,6	45,0	44,3	41,5	39,5	36,2	—

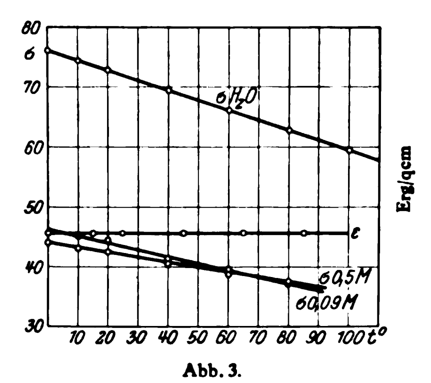


Abb. 3.

Taurocholsaures Natrium.

Der Temperaturkoeffizient des taurocholsauren Natriums bleibt im Verlaufe des ganzen untersuchten Temperaturintervalls von 0 bis 80° C konstant. Im Zusammenhang damit ändert sich die gesamte Oberflächenenergie des taurocholsauren Natriums von 0 bis 100° C ebenfalls nicht mit der Temperatur ($dE/dT = 0$).

Tabelle V.

Temperaturkoeffizient des taurocholsauren Natriums in Erg/qcm.

	C	t	5,0	15,0	25,0	45,0	65,0	85,0
Reines Wasser .	—	$\partial \sigma / \partial T$	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Taurocholsaures Natrium . . .	0,5 Mol.	$\partial \sigma / \partial T$	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10

Tabelle VI.

Gesamte Oberflächenenergie (E) des taurocholsauren Natriums bei verschiedenen Temperaturen in Erg/qcm.

	C	t	5,0	15,0	25,0	45,0	65,0	85,0
Reines Wasser .	—	$E =$	119	119	119	119	119	119
Taurocholsaures Natrium . . .	0,5 Mol.	$E =$	71,8	71,8	71,8	71,8	71,8	71,8

Die Oberflächenspannung des glykochol- und taurocholsauren Natriums fällt mit der Konzentrationszunahme der Lösung anfangs schnell und erreicht darauf den Grenzwert, wie das aus den weiter unten angeführten Tabellen und Kurven ersichtlich ist.

Tabelle VII.

Veränderung der Oberflächenspannung des glykocholsauren Natriums bei verschiedenen Konzentrationen in Erg/qcm.

	C_m g-Mol./Liter	Reines Wasser	0,000 12	0,000 24	0,000 48	0,000 97	0,001 95	0,0039
Glykocholsaures Natrium	$\sigma =$	72, 75	67,53	63,78	57,82	55,47	52,05	47,4

	C_m g-Mol./Liter	Reines Wasser	0,0078	0,001 56	0,0312	0,125	0,250	0,50
Glykocholsaures Natrium	$\sigma =$	72, 75	45,2	41,0	41,0	41,0	41,0	41,0

Tabelle VIII.

Veränderung der Oberflächenspannung des taurocholsauren Natriums bei verschiedenen Konzentrationen in Erg/qcm.

	C g-Mol./Liter	Reines Wasser	0,000016	0,000032	0,000065	0,000130	0,00026	0,00053	0,00106	0,0021
Taurocholsaures Natrium	$\sigma =$	72, 75	71,0	70,3	69,0	66,3	64,2	60,2	53,5	51,8

	C g-Mol./Liter	Reines Wasser	0,00420	0,0085	0,0170	0,034	0,068	0,136	0,273	0,5
Taurocholsaures Natrium	$\sigma =$	72, 75	47,4	41,4	38,5	41,8	42,8	42,8	42,8	43,4

Es ist bemerkenswert, daß die Oberflächenspannung des taurocholsauren Natriums bei einer Konzentration der Lösung von $C = 0{,}017$ g-Mol./Liter etwas geringer ist als die benachbarten Konzentrationen. Letzteres ist mehrfach nachgeprüft worden, und ein Beobachtungsfehler ist augenscheinlich ausgeschlossen. Sehr viel wahrscheinlicher ist die Annahme, daß die Oberflächenspannung durch eine Veränderung des Dissoziationsgrades (α) des Stoffes in der Lösung beeinflußt wird, d. h. durch eine Veränderung des Koeffizienten $i = 1 + \alpha$ (*van 't Hoff*).

Da uns nur eine geringe Menge des zu untersuchenden Stoffes zur Verfügung stand, so konnten wir leider keine spezielle kryoskopische

Untersuchung vornehmen. Nach *MacLewis*[1] dissoziiert das glykochol-saure Natrium vollständig (d. h. $i = 2$).

Die Oberflächenaktivität beider Gallensäuren, die nach *Rehbinder* durch die Größe $G = d\sigma/dc$ charakterisiert wird, stellt in beiden Fällen äußerst steil abfallende Kurven dar.

Die Oberflächeneigenschaften eines Stoffes werden durch seine Adsorptionskurve in der Oberflächenschicht charakterisiert (*Gibbs*). Je aktiver der Stoff ist, desto schneller tritt die endgültige Adsorption mit einer Konzentrationszunahme der Lösung ein. Für schwache Lösungen kann die Adsorption nach folgender Gleichung berechnet werden: $\Gamma(c) = -d\sigma/dc \,.\, c/iRT$ in g-Mol./qcm, wo c die Konzentration des Stoffes in der Lösung, σ die Oberflächenspannung, i der Koeffizient *van 't Hoffs*, R die Gaskonstante, T die absolute Temperatur sind.

Da uns hinsichtlich der Gallensäuren ihr Zustand in der Lösung wie auch ihr Dissoziationsgrad nicht völlig bekannt sind, so ist es vorzuziehen, die Adsorptionskurve nicht in absoluten, sondern in relativen Einheiten zu messen. *Rehbinder*[2] hat in solchen Fällen vorgeschlagen, sich des Produkts der Konzentrationen (c) und der Oberflächenaktivität (G), das der Adsorption (Γ) proportional ist, zu bedienen: $-cG = A\Gamma$.

Die Kurvenform cG muß der Kurvenform Γ völlig entsprechen.

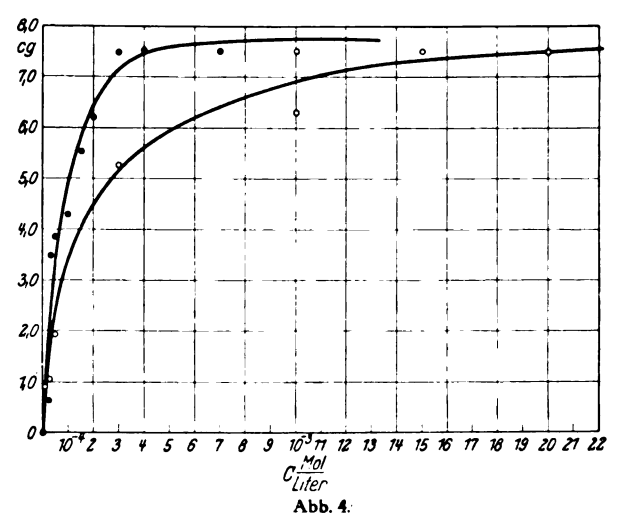


Abb. 4.
Obere Kurve: Glykocholsaures Natrium. Untere Kurve: Taurocholsaures Natrium.

---

[1] *MacLewis*, zitiert nach *Freundlich*, Kapillarchemie 1922.
[2] *P. Rehbinder*, diese Zeitschr. 187, 20, 1927.

Tabelle IX.

Oberflächenaktivität und Adsorption der Gallensäure.

	C Mol./Liter	*G*	*CG*		*C* Mol./Liter	*G*	*CG*
Glykochol-saures Natrium	0,000 02	33 125	0,66	Taurochol-saures Natrium	0,000 008	112 500	0,9
	0,000 05	7 500	3,85		0,000 024	43 750	1,05
	0,000 10	4 375	4,30		0,000 049	39 300	1,93
	0,000 15	3 750	5,53		0,000 30	17 500	5,25
	0,000 20	3 125	6,20		0,001 00	6300–7000	6,3–7,5
	0,000 30	2 500	7,50		0,001 50	5 000	7,5
	0,000 40	1 875	7,50		0,002 0	3 750	7,5
	0,000 70	1 070	7,49		0,003 0	2 500	7,5
					0,004 0	2 000	8,0

Unserer Ansicht nach steht der Unterschied in den Oberflächeneigenschaften des glykochol- und taurocholsauren Natriums sowohl für die Temperatur- als auch für die Konzentrationskurven mit den Struktureigenheiten beider Gallensäuren in Zusammenhang.

Beide Gallensäuren stellen Derivate der Cholsäure, die eine einbasische Säure ist, mit zwei primären und einer sekundären Alkoholgruppe dar (*Strecker*[1]):

$$C_{20}H_{32}\begin{cases}CHOH\\(CH_2OH)_2\\COOH\end{cases} = C_{24}H_{40}O_5.$$

Bei Einführung einer Glykokoll- ($NHCH_2COOH$) oder Taurin-gruppe (CH_2SO_2OH) in die Cholsäure erhalten wir entsprechend Glykochol- oder Taurocholsäure[2]:

$$C_{26}H_{43}NO_6 = C_{23}H_{39}O_3CO\,.\,NHCH_2COOH$$

Glykocholsäure.

$$C_{26}H_{45}NSO_7 = C_{23}H_{39}O_3CONH\,.\,CH_2\,.\,CH_2\,.\,SO_2OH$$

Taurocholsäure.

Das Vorhandensein von Glykocholsäure im Molekül der Seitenkette mit einer Carboxylgruppe bedingt, wie es scheint, ihre Temperaturkurve mit einem Knick bei schwachen Konzentrationen (0,012 Mol.), welche für Lösungen oberflächenaktiver Stoffe typisch ist (*P. Rehbinder*).

Betrachten wir gleichzeitig die Adsorptionskurven (*CG*) (die Isothermen) für beide Natriumsalze der Gallensäuren, so sehen wir, daß die Adsorptionsgrenze für eine glykocholsaure Natriumlösung

[1] *Strecker*, Ann. d. Chem. u. Pharm. **65, 67, 70** (zitiert nach *Hammarsten*, Lehrb. d. phys. Chem. 1914).
[2] *C. Oppenheimer*, Handb. d. phys. Chem. 1923, S. 147.



bedeutend schneller (bei kleineren Konzentrationen) eintritt, als für eine taurocholsaure Natriumlösung (etwa viermal schneller). Diese Adsorptionsgrenze hat in beiden Fällen den gleichen Zahlenwert ($cG = 7,5$). Letzteres kann durch die erwähnten Struktureigenheiten beider Gallensäuren erklärt werden. Hierbei muß nach *Langmuir*[1] und *W. Harkins*[2] die Adsorptionsschicht der Moleküle für beide Gallensäuren einen gemeinsamen oberflächenaktiven polaren Teil haben, der einen Platz in der Oberflächenschicht einnimmt und in das Lösungsinnere hineingezogen wird. Der inaktive Teil der Moleküle, der senkrecht zur Oberfläche orientiert ist und keinen Platz in der Oberflächenschicht einnimmt, ist für Gallensäuren verschieden. Dies erklärt auch den verschieden steilen Anstieg der Kurve und folglich auch den Beginn der Adsorptionsgrenze bei verschiedenen Konzentrationen. Wenn jedoch diese Oberflächenschicht gesättigt ist, verschwinden die Unterschiede in den Oberflächeneigenschaften der Lösungen und wir erhalten gleiche Zahlenwerte für die Adsorption, d. h. wir haben auf der Oberflächeneinheit eine gleiche überschüssige Menge Moleküle in der Oberflächenschicht.

Wenn wir die Temperaturkurven der Oberflächenspannung von Gallensäuren mit der von *Nikolaus Wwedensky*[3] für Ochsengalle erhaltenen Temperaturkurve vergleichen, so müssen wir gleichzeitig zu dem Schluß gelangen, daß die Oberflächeneigenschaften der letzteren, abgesehen von vorhandener Gallensäure, auch durch die Gegenwart anderer Stoffe, welche die Form der Temperaturkurve der Oberflächenspannung wesentlich ändern, bedingt sind. Auf Grund der untersuchten Oberflächeneigenschaften (kapillaren) beider Natriumsalze der Gallensäuren bezweifeln wir überhaupt die Möglichkeit einer quantitativen Bestimmung ihres Gehalts durch Messung der Oberflächenspannung bei gleicher Temperatur in verschiedenen Flüssigkeiten, z. B. im Harn oder sogar in der Galle bei normalen und pathologischen Zuständen des lebenden Organismus, wie man das zu tun versucht hat. Die molekularen Eigenschaften der Gallensäuren und ihrer Salze in Zusammenhang mit der ungewöhnlich großen Oberflächenaktivität ihrer Lösungen lassen vor uns das wesentlichere Problem über die Rolle der hier beobachteten Adsorptionserscheinungen in einer Reihe physiologischer und pathologischer Prozesse erstehen, wie z. B. Emulgierung von Fetten, Aktivierung von Fermenten, hämolytische Gallensucht (Ikterus), Färbung der Gewebe bei Gallensucht.

---

[1] *Langmuir*, Journ. Am. Chem. Soc. **39**, 1848, 1917.

[2] *W. D. Harkins*, ebendaselbst **43**, 35, 1921.

[3] *Nik. Wwedensky*, Oberflächenenergie einiger physiologischer Flüssigkeiten, Journ. exper. biol. Med. Nr. 14, 1927; diese Zeitschr. **188**, 270, 1927.

Es muß bemerkt werden, daß die Untersuchung von Gallensäurelösungen infolge des semikolloiden Charakters der Lösungen viele Schwierigkeiten bietet. Daher ist es notwendig, sich stets frisch hergestellter Lösungen, wie wir es getan haben, zu bedienen.

Zum Schluß sei noch darauf hingewiesen, daß Lösungen glykocholsauren Natriums schon bei einer Konzentration $C_m = 0{,}0039$ Mol. und Lösungen taurocholsauren Natriums bei $C_m = 0{,}0056$ Mol. farblos werden.

Zusammenfassung.

1. Die Untersuchung wässeriger Lösungen glykochol- und taurocholsauren Natriums hat ihre Zugehörigkeit zu der Gruppe außerordentlich oberflächenaktiver Stoffe festgestellt.

2. Es sind die Temperatur- und Konzentrationskurven der Oberflächenspannung glykochol- und taurocholsauren Natriums gemessen. Die Oberflächenspannung glykochol- und taurocholsauren Natriums bei verhältnismäßig großen Konzentrationen nimmt mit der Temperatur linear ab; ihr Temperaturkoeffizient ist bedeutend kleiner als der für reines Wasser; die gesamte Oberflächenenergie (E) ist ebenfalls kleiner, als bei reinem Wasser. Die Oberflächenspannung des glykocholsauren Natriums nimmt bei kleinen Konzentrationen (0,012 Mol.) mit der Temperatur nach einer typischen, zur Abszissenachse stark gekrümmten Kurve ab.

3. Es ist nachgewiesen, daß die Oberflächenaktivität (G) der Natriumsalze beider Gallensäuren bei kleinen Konzentrationen außerordentlich groß ist und mit einer Konzentrationszunahme der Lösung rapid abnimmt.

4. Die Adsorptionsgrenze ($cG = A\Gamma$) ∞ wird für beide Gallensäuren sehr schnell — schon bei kleinen Konzentrationen der Lösung — erreicht.



Zur Biochemie der Strahlenwirkungen.

VI. Mitteilung:

Der Röntgenstrahleneinfluß auf die Durchlässigkeit der überlebenden Froschhautmembran.

Von

Christian Kroetz.

(Aus der Medizinischen Klinik der Universität Greifswald.)

(Eingegangen am 1. Oktober 1927.)

I. Einleitung.

1. Angriffsorte der Strahlen in der Zelle.

Der Strahleneinfluß auf die lebende Zelle setzt sich zusammen aus der Strahleneinwirkung auf den Kern, das Cytoplasma und die Zellmembran. Unter besonders gewählten Versuchsbedingungen lassen sich, je nach Wahl des Versuchsobjektes sowie der Wellenlängen und der Dosierung der einfallenden Strahlung im Frühstadium der Strahlennachwirkung einmal Kernveränderungen, ein anderes Mal Plasmastrukturveränderungen, ein drittes Mal Membranbeeinflussungen ziemlich isoliert, ohne entsprechend ausgeprägte Strahlenfolgen an den zwei übrigen Zellgebilden, zur Anschauung bringen.

Der Strahleneinfluß auf den Zellkern ist besonders bei Verwendung histologischer Technik so auffallend, daß oft die Änderungen am Protoplasma ganz übersehen wurden. Lange Zeit schien daher die überwiegende Bedeutung des Zellkerns vor dem Protoplasma für die Entstehung der Strahlenschädigung der Zellen gesichert und seit den Untersuchungen *Heinickes* (1) an Lymphocyten (mit Röntgenstrahlen), *O. Hertwigs* (2) an Froscheiern und Spermatozoen (mit Radiumstrahlen) ist immer wieder, zuletzt von *Reiss* (3), die erhöhte Kernempfindlichkeit betont worden. Es ist unentschieden, wieweit hier die Begrenztheit der Methodik die Beobachtung von Frühveränderungen am Protoplasma verhindert hat. Jedenfalls häufen sich in den letzten Jahren die Feststellungen, wonach nach kleinen und mittleren Strahlendosen am Protoplasma zeitlich viel früher Strukturveränderungen auftreten als am Kern. *Strangeways* und *Oakley* (4) beobachteten an Gewebskulturen der Chorioidea von Hühnerembryonen zum Zeitpunkt eben deutlich werdender Kernschwellung schon beginnende Koagulation am Protoplasma, erkennbar an auftretender Granulation

der vorher homogenen Struktur. An Amöben fanden *Barr* und *Bovie* (5) für ultraviolettes Licht, *Nakashima* (6) für Röntgenstrahlung, *Zülzer* und *Philipp* (7) für Radiumstrahlen (γ-Anteil) zuerst Änderungen der Strömung, dann der Quellung und hierauf des Lösungszustandes des Protoplasmas, die erst später von Kernerscheinungen gefolgt waren. Ähnliches berichteten *Nadson* und Mitarbeiter (8) über Pflanzenzellen. Alle Beobachter deuteten die Vorgänge am bestrahlten Protoplasma als Ausdruck von physikalisch-chemischen Zustandsänderungen der Cytoplasmakolloide. Isolierte Beeinflussung der Zellmembran gestattet unter recht reinen Versuchsbedingungen die Anordnung von *Tchahotine* (9); er richtete unter dem Mikroskop einen feinen Strahl Ultraviolettlichtes auf ein Seeigelei und erzeugte auf diese Weise eine punktförmige Verletzung der Zellmembran. Das Ei, welches vorher mit Neutralrot angefärbt war, hatte in einem schwach alkalischen Außenmedium seine Rotfärbung behalten, weil seine Membran für OH-Ionen impermeabel ist. Nun aber trat von der radiopunktierten Stelle aus ein Farbumschlag im Eiinnern auf, weil die OH-Ionen jetzt eindringen konnten. Gleichzeitige Änderungen des Lösungszustandes von Plasma und Kern wurden bei dieser Anordnung nicht manifest.

Die besonders ausgeprägte, mehr oder weniger stark überwiegende Einwirkung einer Strahlung auf Kern, Plasma oder Membran ist weniger abhängig von der Durchdringungsfähigkeit der Strahlung, als von dem Vorhandensein eines etwaigen selektiven Absorptionsvermögens einzelner Zellbestandteile und von dem physikalisch-chemischen Zustande einzelner Zellkolloide. Röntgen- und γ-Radiumstrahlen werden infolge ihrer hohen Durchdringungsfähigkeit bei der Größenordnung tierischer Zellen stets gleichzeitig an Kern, Plasma und Membran angreifen, aber auch für das sichtbare und ultraviolette Licht wird diese Voraussetzung gelten. Selektive Absorption spielt eine praktisch bedeutsame Rolle nur im sichtbaren und ultravioletten Gebiet; mit monochromatischem Licht werden sich hier entsprechend dem verschiedenen kolloidalen Aufbau von Kern, Plasma und Membran mehr oder weniger isolierte Veränderungen setzen lassen. Schwankungen im physikalisch-chemischen Lösungszustande der Zellkolloide nimmt man während des Teilungsvorganges besonders für den Kern an; grob willkürlicher Beeinflussung des Lösungszustandes sind bei Einzellern die Membrankolloide zugänglich, indem sie verschiedenem Ionengehalt des Außenmilieus ausgesetzt werden [*Holthusen* (26), *Kroetz* (27)].

Für ein *durchschnittliches* biologisches Objekt wird es nach dem Gesagten stets Schwierigkeiten bieten, innerhalb der Ganzheit der Strahlenfolgen den Strahleneinfluß auf Kern, Plasma, Membran abzugrenzen, oder die größere oder geringere Bedeutung des Strahleneinflusses auf eine dieser Phasen für das Eintreten der Gesamtheit der Strahlenschädigung der Zelle klarzustellen. Aber ebenso wie das Studium der Strahlenwirkung auf das biologische *Einzel*objekt einer solchen Betrachtungsweise Erfolge verdankt, kann man von solchen differenzierenden Versuchen vielleicht einmal eine Förderung erhoffen

für das allgemeine Problem der Schwankungen der Strahlenempfindlichkeit der verschiedenen Zellen und Gewebe.

2. *Zellmembran und Strahleneinfluß.*

Im besonderen den Strahleneinfluß auf die Zellmembran zu untersuchen, ist aus zwei Gründen nahegelegt.

Das Permeabilitätsproblem lebender Zellen ist vor allem durch die Einführung der Begriffe einer passiven physikalischen Permeabilität und einer funktionell eingestellten physiologischen Permeabilität (10) gefördert worden. Diese letztere ist durch den physikalisch-chemischen Lösungszustand der Zellhautkolloide geregelt, und sie macht die Aufnahme und Abgabe lipoidunlöslicher Stoffe einerseits von den Vorgängen im Zellinnern, andererseits von den physikalisch-chemischen Bedingungen des Außenmediums abhängig. Durch die neueren Arbeiten von *Michaelis* (11) ist gezeigt worden, daß eine derartige auswählende Permeabilität auch bei einfachen Membranmodellen, die zunächst als Molekülsieb wirken, vorkommt, und daß sie außer von den Besonderheiten des Baues der Membran (Porengröße, Hydratation) vor allem von Änderungen der elektrischen Ladung der Membranwand abhängig ist. Nun führt eine der ältesten Vorstellungen über die Wirkungsart der Strahlungen im lebenden Gewebe die strahlenbewirkten Kolloidveränderungen auf Ladungsverminderungen der kolloidalen Teilchen zurück, und so könnte der Strahleneinfluß auf Membranwände auch für das allgemeine Problem der Permeabilität von Bedeutung sein. Tatsächlich sind denn auch vor kurzem von *Liechti* (12) Beobachtungen vorgelegt worden, wonach es unter dem Einfluß der Röntgenstrahlen an Ölketten und *Cremer*schen Glasketten zu kurzdauernden, streng auf die Dauer der Strahleneinwirkung begrenzten Änderungen der elektromotorischen Kraft dieser Ketten kommt.

Andererseits hat die Förderung der Kentnnisse über den Mineralhaushalt bestrahlter Tiere und Menschen bemerkenswerte Verschiebungen im Ionengehalt der Säfte und Gewebe nach der Bestrahlung ergeben. Im Blute bestrahlter Menschen zeigen besonders die Zellionen *K* und *P*, aber auch die anderen Ionen langanhaltende Konzentrationsänderungen [*Kroetz* (13)], die auf eine Veränderung des Stoffaustausches zwischen den bestrahlten Geweben und Körpersäften hinweisen, und es lag nahe [*Kroetz* (13)], sie auf eine Strahlenbeeinflussung der Durchlässigkeit der Zellhäute für Elektrolyte zu beziehen. Auch im Gewebe bestrahlter Tiere lassen sich sowohl mit histochemischen Methoden [*Gans* (14) und *Lieber* (15)] als mit einwandfreier analytischer Bestimmung [*Degkwitz* (16), *Pincussen* (17)] ausgeprägte Ionenverschiebungen einerseits zwischen bestrahlten und unbestrahlten Gewebsabschnitten, andererseits zwischen bestrahlten und unbestrahlten Tieren feststellen. Ebenso treten im Stoffwechselversuch am Menschen diese Umstellungen des Elektrolytmilieus nach der Bestrahlung recht deutlich in Erscheinung. Es ließ sich in *eigenen* Versuchen (18) zeigen, daß der Körper an K und P reicher, an Na und Cl relativ ärmer wird. Wenn man sich erinnert, daß man im K und P die quantitativ ausschlaggebenden Gewebsionen, im Na und Cl die quantitativ ausschlaggebenden Säfteionen vor sich hat, so ergibt sich in diesem Verhalten ein weiterer Hinweis auf die Entstehung bioelektrischer Potentialdifferenzen im belichteten Gewebe. Bei der sehr langen Fortdauer dieser Elektrolyt-

verschiebungen im belichteten Organismus, noch Wochen nach der direkten Strahleneinwirkung, wird sich die Frage erheben, wieweit die wahrscheinliche Permeabilitätsänderung allein mit einer Ladungsbeeinflussung der Membranwände erklärbar ist, wieweit darüber hinaus mit dem Einfluß chemischer Denaturierungsvorgänge an den Baustoffen der Membran und mit anschließenden Änderungen der Dissoziationskonstanten und Ionenabsorption der Membrankolloide zu rechnen ist.

II. Versuche über Durchlässigkeitsänderungen der Froschhaut unter Strahleneinfluß.

1. *Versuchsmaterial und Methodik.*

Membransäcke aus der überlebenden Haut der Froschschenkel sind nach dem Vorgang amerikanischer Forscher besonders von *Wertheimer* (19) für die Bearbeitung von Permeabilitätsfragen benutzt worden. Wenn es sich bei diesem Objekt auch nicht um eine einfache Zellage, sondern um eine geschichtete Membran handelt, so hat es sich doch als wertvolles biologisches Modell für den genannten Zweck bewährt. Die Froschhaut besitzt nach *Wertheimer* eine irreziproke Permeabilität für Salze, Zucker, Aminosäuren und Eiweiße. Schon geringe chemische Änderungen des Innen- oder Außenmilieus können die Durchlässigkeit für eine bestimmte Substanz in ihr Gegenteil umschlagen lassen. Es seien nur diejenigen Teilverhältnisse besprochen, deren Beeinflussung durch Strahleneinwirkung in den nachstehenden Versuchen verglichen wird. Die normale, frisch verwendete Froschhaut gewährt, wenn Wasser die Hautaußenfläche benetzt, in der Richtung Innenfläche → Außenfläche Kochsalz (titriert wurde Cl) weder aus Ringerlösung noch aus Serum den Durchtritt, während sie es aus nicht äquilibrierter isotonischer NaCl-Lösung ungehindert passieren läßt; in derselben Richtung vermag bei Ringerbespülung der Hautaußenfläche Traubenzucker zwar aus einer isotonischen Traubenzuckerlösung durch die Froschhaut durchzutreten, nicht aber aus einer Mischung gleicher Teile von isotonischer Traubenzucker- und Ringerlösung. Ferner ist in der genannten Richtung sauren Farbstoffen, wie Trypanblau und Lichtgrün, die in Ringer gelöst sind, der Durchtritt in eine die Hautaußenfläche berührende Ringerlösung verwehrt, ebenso in der umgekehrten Richtung, Hautaußenfläche → Innenfläche, den in Ringer gelösten basischen Farbstoffen (z. B. Methylviolett und Gentianaviolett) der Durchtritt in eine die Hautinnenfläche benetzende Ringerlösung.

Die in den folgenden Versuchen angewendete Methodik war im Anschluß an *Wertheimer* die folgende. Frühjahrswasserfrösche, die aus der Maingegend frisch bezogen waren und ein Durchschnittsgewicht von 55 bis 75 g hatten, wurden dekapitiert, die Medulla zerstört, der Rumpf abgetrennt, das Becken in der Mittellinie durchschnitten und die Haut jedes Beines einzeln abgezogen, was leicht gelang, wenn an der Unterlage einige Bindegewebsstränge während des Zuges durchtrennt wurden. Nach eventueller Umkehrung des Beinschlauches folgte die untere Abbindung und die Aufhängung an einem für Reihenuntersuchungen geeigneten langen, queren Glasstab, dann die Füllung des Beinschlauches mit der Innenflüssigkeit, die Beobachtung auf Dichtigkeit des Sackes, darauf die obere Abbindung und endlich das Eintauchen in das Außenmedium, welches in 22 mm weiten und 8 bis 10 cm hohen zylinderförmigen Reagenzgläsern bereit gehalten war.



Die Versuche an Tieren, die *in vivo bestrahlt* werden sollten, wurden so durchgeführt, daß auf einem Brette, welches mit ringergetränktem Filtrierpapier bedeckt war, Frösche mit ringerbenetzten Gazestreifen an Haltehaken angebunden wurden. Vier Frösche wurden gleichzeitig in Versuch genommen, Rumpf und *ein* Bein peripher aufgespannt, das andere in der Mitte des Brettes befestigt, so daß Rumpf und Kontrollbein mit Blei (12 mm) abgedeckt werden konnten. Das Blei lag auf Randleisten des Bestrahlungsbrettes auf und berührte nirgends die Frösche.

Für Versuche, in denen das Verhalten der *in vitro bestrahlten* Beinhaut beobachtet werden sollte, waren die zur Bestrahlung bestimmten, frisch abgezogenen Hautschläuche und die Kontrollschläuche in gleichartigen flachen Gefäßen in Ringerlösung untergebracht, wurden dann nebeneinander unter der Röntgenröhre aufgestellt (Abdeckung der Kontrollschläuche mit einer Bleischicht von 12 mm). Die Licht- und Wärmestrahlung der Glühkathodenröhre war durch ein 3 mm dickes Pappfilter abgehalten.

Die verwendete Röntgenstrahlung umfaßte einen möglichst großen Spektralbereich, das dünne Pappfilter hielt nur die allerweichsten Strahlen ab. Metallfilterung unterblieb. Die effektive Kilovoltzahl betrug 102 bis 110 Kilovolt; härteste Strahlen waren in dem Gemisch also nicht enthalten. Röhrenbelastung 2,75 Milliamp.; Bestrahlungszeit 1 bis 3 Stunden; Fokus-Objekt-Abstand 21 cm. Die verwendete Dosis betrug bei den in vitro bestrahlten Hautmembranen teils 10, teils 30 menschliche Erythemdosen, bei den in vivo bestrahlten durchweg 30 HED. Die Größe dieser Dosen, die physiologische Grenzen zu übersteigen scheint, war durch die bekannte hohe Resistenz der Frösche [*Cavalaska* (20)] gegen Röntgenstrahlen erfordert; in seinen Versuchen führte eine Dosis von 5 bis 10 HED nach 3 Wochen zum Tode des Tieres; in den eigenen Versuchen starben die mit 30 HED belegten Tiere meist am siebenten bis achten Tage, nur ausnahmsweise früher.

2. *Chlordurchlässigkeit der in vivo bestrahlten Froschhäute.*

Die Versuche zeigten eine Steigerung der Elektrolytdurchlässigkeit für den in vivo bestrahlten Hautschlauch, gegenüber dem abgedeckten, nicht von direkter Strahleneinwirkung getroffenen Hautschlauch des gleichen Tieres. Im einzelnen sind die durchweg eindeutigen Ergebnisse dieser Versuchsreihe in Tabelle I wiedergegeben. Während aus unbestrahlten Froschhäuten, deren Hautinnenseite nach innen gerichtet war und an Ringerlösung bzw. Serum als Innenmedium grenzte, nur Spuren Chlor in das als Außenmedium verwendete destillierte Wasser übertraten, trat aus gleichartig verarbeiteten bestrahlten Froschhäuten Chlor in ein- bis fünfmal größerer Menge durch. Die durchschnittliche Menge des ausgetretenen Chlors (Cl-Bestimmung nach *Volhard*) betrug in den acht Versuchen der Tabelle I für die *unbestrahlte* Beinhaut 0,675 ccm n/100 $AgNO_3$, für die *bestrahlte* Beinhaut des gleichen Tieres 1,9875 ccm n/100 $AgNO_3$. Die durchschnittlich ausgetretene Chlormenge ist also fast auf das Dreifache angestiegen. Diese Ablesungen beziehen sich auf die Außenflüssigkeiten, die nach 6 Stunden gewechselt wurden; die Unterschiede waren in dem zweiten und dritten Außenmedium, das nach 12 bis 24 Stunden wieder entnommen wurde, zum Teil in gleicher Ausprägung vorhanden, nicht selten aber, besonders nach 24 Stunden, mehr oder weniger vollständig verwischt. Diese späten Störungen sind auf beginnende Absterbeerscheinungen der Membran zu beziehen, auch *Wertheimer* hat sie bei

Tabelle I.

Wasserfrösche in vivo mit etwa 30 HED (110 kV effektiv) bestrahlt. Nach 3 Stunden getötet, Hautschläuche sofort zum Versuch angesetzt. Versuch nach 6 Stunden beendet, Chlorgehalt der Außenflüssigkeit titriert.

Versuch Nr.	Hautinnenseite liegt	Durchtrittsrichtung	Innenfüllung	Außenflüssigkeit	Chloriddurchtritt als Verbrauch von ccm n/100 $AgNO_3$		Differenz am bestrahlten Bein
					unbestr.	bestrahlt	
45	innen	Innen → außen	4 ccm Ringer	Aq. dest.	0,5	2,5	+ 2,0
46	"	" "	4 " "	" "	0,5	1,7	+ 1,2
47	"	" "	4 " "	" "	0,6	1,2	+ 0,6
54	"	" "	4 " "	" "	0,7	1,8	+ 1,1
48	"	" "	3 " Serum	" "	0,6	1,6	+ 1,0
51	"	" "	4 " "	" "	0,8	2,1	+ 1,3
52	"	" "	3,5 " "	" "	1,0	2,6	+ 1,6
53	"	" "	4 " "	" "	0,7	2,4	+ 1,7
				Mittel:	0,675	1,9875	+ 1,3125
				Steigerung:	198 %		

längerer Versuchsausdehnung beobachtet. Immerhin boten sie zusammen mit den relativ geringen Mengen des Chlordurchtritts Anlaß, die Versuchsbedingungen möglichst zu verfeinern und den Versuchsverlauf mit besonderen Vorsichtsmaßregeln zu sichern. Im einzelnen wurde hierbei auf folgendes geachtet. Die Ringerlösung des Innenmediums war froschisotonisch und wurde jeweils vor dem Versuch durch Mischen gleicher Teile von Lösung I ($NaCl$ 6,0, $NaHCO_3$ 0,2, Aqua dest. zu 1000,0), Lösung 2 (KCl 0,4, $CaCl_2$ 0,2, Aqua dest. zu 1000,0) frisch hergestellt. Wurde menschliches Serum als Innenmedium verwendet, so wurde es mit destilliertem Wasser auf Froschisotonie verdünnt. Die Beinhäute wurden vor der Ablösung vorsichtig mit Wasser vom anhaftenden Hautschleim gereinigt und nach erfolgter Innenfüllung und Dichteprüfung des Schlauches an der Außenfläche mehrfach kurz mit destilliertem Wasser berieselt; dann erst wurden sie in die Außenflüssigkeit eingetaucht. Diese wurde nach ½ Stunde gewechselt und auf Chlor titriert und so eine weitere Sicherung gegen Undichtigkeit eingeführt. Die Dichte des Hautschlauches, die bei den serumgefüllten Membranen auch aus der absoluten Eiweißfreiheit der Außenflüssigkeit (mit dem Sulfosalicylsäurereagens geprüft) hervorgeht, kommt bei dem Kontrollversuch mit der unbestrahlten Beinhaut im Chlorgehalt der Außenflüssigkeit nach 6- und 12stündiger Dialyse zum Ausdruck; er bleibt meist unter 1,0 ccm einer n/100 $AgNO_3$-Lösung und steigt in den verwerteten Versuchen nie über 1,0 ccm n/100 $AgNO_3$-Lösung. Diese sehr geringen Mengen von Chlor, die am Kontrollschlauch durchtreten, halten sich im Rahmen dessen, was auch *Wertheimer* beobachtet hat. Wo ein ungehemmter Durchtritt des Salzes erfolgt oder ein unsichtbarer Einriß der Membran vorliegt, findet die Chlortitration 10- bis 15mal größere Mengen vor. Unter diesen Vorsichtsmaßregeln können die gesteigerten Chlormengen, die durch die bestrahlte Beinhaut austreten, mit Bestimmtheit aufgefaßt werden als Ausdruck einer erhöhten Chlordurchlässigkeit der bestrahlten Membran im Vergleich mit derjenigen des unbeeinflußten Beines.

Entsprechende Untersuchungen über eine Steigerung der Kationendurchlässigkeit bestrahlter Membranen führten wegen der analytischen Schwierigkeiten bei der Bestimmung kleinster Natrium- und Kaliummengen zu keinem Ergebnis; jedenfalls zeigen sie aber, daß die Kationen durch bestrahlte Membranen quantitativ nicht erkennbar stärker durchgelassen werden als die Anionen.

3. Durchlässigkeit für Traubenzucker, für saure und basische Vitalfarbstoffe, für Eiweiß.

In den Traubenzuckerversuchen befand sich der Zucker in einem Zucker-Salzgemisch (aus gleichen Teilen isotonischer Ringer- und Traubenzuckerlösung) im Innern des Hautschlauches; die beobachtete Durchtrittsrichtung war die von der Innenseite der Haut nach ihrer Außenseite, an die letztere grenzte Ringerlösung als Außenflüssigkeit. Die unbestrahlte Membran läßt in dieser Anordnung keinen Traubenzucker durch, in der eingeengten Außenflüssigkeit läßt sich weder mit der *Nylander*schen Reduktionsprobe noch polarimetrisch Zucker nachweisen. Die bestrahlte Membran zeigte in vier von sechs Versuchen eine positive *Nylander*sche Probe in der Außenflüssigkeit (s. Tabelle II). Es kann daher der bestrahlten

Tabelle II.

Wasserfrösche, behandelt wie diejenigen in Tabelle I. Versuchsende nach 6 Stunden; Reduktionsproben (*Trommer*, *Nylander*) in der Außenflüssigkeit.

Versuch Nr.	Hautinnenseite liegt	Durchtrittsrichtung	ccm Traubenzucker + Ringer ans	Reduktion unbestrahlt	Reduktion bestrahlt
57	innen	Innen → außen	4,0 innen	0	+
58	„	„ „	4,0 „	0	±
59	„	„ „	3,0 „	0	0
60	außen	Außen → innen	5,5 „	±	0
61	„	„ „	4,0 „	0	+
62	„	„ „	3,5 „	0	±

Tabelle III.

Wasserfrösche, ebenso behandelt wie die in Tabelle I benannten. Tötung 3 Stunden nach Beendigung der Bestrahlung, sofortige Verarbeitung. Versuchsende nach 6 Stunden, Ablesung der Farbunterschiede in der Außenflüssigkeit.

Versuch Nr.	Hautinnenseite liegt	Durchtrittsrichtung	Innenfüllung	Außenflüssigkeit	Farbgrad der Außenflüssigkeit unbestr.	Farbgrad der Außenflüssigkeit bestrahlt	Differenz am bestrahlten Bein
42	außen	Außen → innen	Lichtgrün 1/500 in Ringer	Ringer	Spur	Spur	±
43	„	„ „	Dasselbe	„	„	0—Spur	—
41	innen	Innen → außen	„	„	„	Spur	± 0
38	„	„ „	„	„	„	„	± 0
40	„	„ „	Methylviolett 6 B extra 1/500 in Ringer	„	stark	stark	± 0
44	außen	Außen → innen	Dasselbe	„	Spur	Spur–etw.	+
39	„	„ „	„	„	„	Spur	± 0

Weitere Versuche, zum Teil an Temporariern, die nur mit 10 menschlichen HED bestrahlt wurden, hatten dasselbe negative Ergebnis.

Froschhaut eine geringe, eben angedeutete Steigerung der Membrandurchlässigkeit für Traubenzucker zugewiesen werden.

Die Versuche über eine strahlenbewirkte Durchlässigkeitssteigerung der Membran für Vitalfarbstoffe hatten ein negatives Ergebnis. Weder in der Geschwindigkeit noch im Ausmaß des Farbdurchtritts war ein ablesbarer Unterschied zwischen bestrahlter und unbestrahlter Froschhaut zu erkennen (s. Tabelle III). Die Strahlendosen waren dieselben wie in Tabelle I.

Die Undurchgängigkeit der Froschhaut, sowohl der bestrahlten als der unbeeinflußten, für Eiweiß war schon bei den Versuchen mit Serum erwähnt worden.

4. *Unterschiede zwischen den in vivo und in vitro bestrahlten Hautmembranen.*

Wurden die Beinhäute von Wasserfröschen (der gleichen Lieferung) statt wie im vorstehenden in vitro bestrahlt, so waren die beobachteten Durchlässigkeitszunahmen wesentlich weniger ausgesprochen; im einzelnen sind sie teils so gering, daß sie innerhalb der Fehlergrenzen liegen, teils sogar negativ. Die mittlere Durchlässigkeitssteigerung für Chlor, die bei sechs in Tabelle IVA berichteten Versuchen für die in vitro bestrahlte

Tabelle IV.

Versuch an in vitro bestrahlten Membranen von Wasserfröschen. Die Membranen liegen während der Bestrahlung in Ringer. Die Kontrollmembranen befinden sich unter sonst gleichen Bedingungen, aber in einem mit 12 mm Blei abgedeckten Gefäß, neben dem der Strahlung ausgesetzten Behälter.

Versuch Nr.	Hautinnenseite liegt	Durchtrittsrichtung	Innenfüllung	Außenflüssigkeit	Chlordurchtritt als Verbrauch an ccm n/100 $AgNO_3$		Differenz am bestrahlten Bein
					unbestr.	bestrahlt	
			A. Kochsalzpermeabilität.				
18	innen	Innen→außen	3,0 Serum	Aq. dest.	0,40	0,55	+ 0,15
20	„	„ „	4,0 „	„	0,20	0,90	+ 0,70
26	„	„ „	3,0 „	„	0,20	0,45	+ 0,25
27	„	„ „	3,0 „	„	0,20	0,40	+ 0,20
28	„	„ „	3,5 „	„	0,60	0,40	— 0,20
19	„	„ „	4,0 Ringer	„	0,20	0,25	+ 0,05
				Mittel:	0,30	0,49	+ 0,19
				Steigerung:	63 %		
			B. Farbstoffpermeabilität.				
					Farbgrad unbestr.	Farbgrad bestrahlt	Differenz
13	außen	Außen→innen	2,0 Lichtgrün		0—Spur	Spur	±
14	innen	Innen→außen	2,0 „		Spur	0—Spur	—
21	„	„ „	4,0 „		0—Spur	Spur	±
11	außen	Außen→innen	1,5 Methylviolett		Spur	Spur–deutl.	±
12	„	„ „	1,5 „		„	Spur	0
29	„	„ „	3,5 „		„	„	0
15	innen	Innen→außen	1,0 Neutralrot		etwas	etwas	0

Membran + 63% beträgt, ist demnach, wenn überhaupt, so nur im Zusammenhang mit dem eindeutigen Befund einer Permeabilitätssteigerung an in vivo bestrahlten Membranen zu verwerten. Bei der Durchlässigkeit für Zucker, Farbstoffe (Tabelle IVB), Eiweiß lassen sich Unterschiede nicht feststellen.

5. Kein durchlässigkeitssteigernder Einfluß von bestrahlten Seren und Hämoglobinlösungen.

Die verschiedene Durchlässigkeitssteigerung für Elektrolyte bei den in vivo bzw. den in vitro bestrahlten Membranen kann daran denken lassen, ob hier Eiweißzerfallsprodukte eine Rolle spielen, die während der Bestrahlung im Tierkörper entstehen, stark oberflächenaktiv sind und, beim lebend bestrahlten Tiere durch den Kreislauf dauernd an die Membran herangeführt, so deren Durchlässigkeit in stärkerem Grade als beim in vitro-Versuch beeinflussen. Deshalb wurden in einer weiteren Versuchsreihe

Tabelle V.

A. Unbestrahlte Hautmembranen von Wasserfröschen. Vergleich des Chlordurchtritts aus bestrahltem und unbestrahltem Serum. Die Bestrahlung des Serums war 5 Stunden lang unter der Höhensonne vorgenommen. Versuchsende nach 6 Stunden. Chlortitration in der Außenflüssigkeit.

Versuch Nr.	Hautinnenseite liegt	Durchtrittsrichtung	Innenfüllung	Außenflüssigkeit	Verbrauch von n/100 $AgNO_3$ unbestr.	Verbrauch von n/100 $AgNO_3$ bestrahlt	Differenz
16	innen	Innen→außen	3,0 Serum	Aq. dest.	0,6	1,0	+ 0,4
17	„	„ „	3,0 „	„ „	0,3	0,4	+ 0,1
22	„	„ „	4,0 „	„ „	0,25	0,4	+ 0,15
23	„	„ „	3,0 „	„ „	0,6	0,2	— 0,4
24	„	„ „	1,8 „	„ „	0,2	0,6	+ 0,4
25	„	„ „	3,0 „	„ „	0,3	0,4	+ 0,1
30	„	„ „	3,0 „	„ „	0,3	0,1	— 0,2
31	„	„ „	3,5 „	„ „	0,3	0,4	+ 0,1
32	„	„ „	4,0 Hämoglobinlösung	„ „	0,6	0,5	— 0,1
33	„	„ „	4,0 dieselbe	„ „	0,2	0,2	0
34	„	„ „	4,0 „	„ „	0,45	0,4	— 0,05
35	„	„ „	3,0 Serum	„ „	0,2	0,2	0
36	„	„ „	4,0 „	„ „	0,1	0,4	+ 0,3
37	„	„ „	4,0 „	„ „	0,3	0,4	+ 0,1
				Mittel:	0,336	0,4	+ 0,063
				Steigerung:		19,0 %	

B. Versuche an beiderseitig bestrahlten Membranen. Verglichen bestrahltes und unbestrahltes Serum, wie oben.

55	innen	Innen→außen	4,0 Serum	Aq. dest.	0,6	1,9	+ 1,3
56	„	„ „	3,5 „	„ „	1,0	2,3	+ 1,3
				Mittel:	0,80	2,10	+ 1,3
				Steigerung:		162,5 %	

(Tabelle V) bestrahltes Serum und bestrahlte Hämoglobinlösungen daraufhin untersucht, ob sie an unbestrahlten bzw. bestrahlten Membranen eine Änderung der Durchlässigkeit hervorrufen können. Die Versuche zeigen, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen ein solcher Einfluß von oberflächenaktiven Reaktionsprodukten des photochemischen Prozesses nicht nachweisbar ist. Entweder ist also ihre Konzentration zu gering, oder ihre Einwirkung auf die Membrandurchlässigkeit zu schwach. Man hat demnach die Unterschiede der in vivo- und in vitro-Versuche auf anderem Wege zu deuten und man dürfte nach dem heutigen Stande unseres Wissens den maßgebenden Faktor in der Verschiedenheit der Sauerstoffversorgung der in vivo und der in vitro bestrahlten Membranen zu suchen haben. Die ersten Beweise für die Rolle des Sauerstoffs beim Ablauf der photolytischen Prozesse an Proteinen und anderen organischen Baustoffen hat *Neuberg* (21) mitgeteilt, ohne daß die Menge verbrauchten Sauerstoffs direkt gemessen wurde. Mit *Barcroft*scher Methodik hat 1920 *Holthusen* (22) in noch unveröffentlichten Versuchen, deren Kenntnis ich Herrn Prof. *Holthusen* verdanke, die ersten Messungen der Sauerstoffaufnahme durch Eiweißlösungen während deren Bestrahlung vorgenommen. In neuesten Versuchen wurde dann von *Harris* (23) und gleichzeitig von *Gaffron* (24) gezeigt, daß der photolytische Prozeß an einigen Aminosäuren, besonders Tyrosin und Tryptophan, unter Sauerstoffverbrauch vor sich geht und bei Sauerstoffmangel geringere Intensität zeigt. Das gleiche fand *Wels* (25) in seinen Untersuchungen über die Fluoreszenzsteigerungen von bestrahlten Eiweißlösungen, die auf intramolekulare Umlagerungen unter Röntgeneinfluß hinwiesen. In meinem Referat (28) auf der Hamburger Tagung der Deutschen Gesellschaft für Lichtforschung (September 1927) wurden diese Zusammenhänge ausführlich besprochen.

6. Zur Reversibilität derartiger Permeabilitätsänderungen von Zellmembranen.

Die begrenzte Lebensdauer der überlebenden Hautmembran verbietet direkte Untersuchungen über den reversiblen oder irreversiblen Charakter der Permeabilitätsänderung. Das Froschhautmembranmodell zeigt nach der 18. bis 24. Stunde des Versuchs auch am unbeeinflußten Hautschlauch rasch zunehmende Absterbeerscheinungen, kenntlich an sprunghaft zunehmender Permeabilitätssteigerung. Daraus kann man einerseits zwar schließen, daß die in den ersten 6 bis 18 Stunden der Strahlennachwirkung beobachtete, quantitativ doch recht bescheidene Zunahme der Chlordurchlässigkeit nicht der Ausdruck von Absterbeerscheinungen ist. Aber andererseits lassen sich aus dem geringen Ausmaß der Durchlässigkeitssteigerung auch keine Aussagen über den reversiblen oder irreversiblen Charakter der Durchlässigkeitsänderung entnehmen. Die Annahme, das Licht greife in reversibler Weise in das feine Spiel der Zellgrenzschichtdurchlässigkeit ein, ist durch den vorhandenen Tatsachenbestand leider nicht zu belegen. Im Gegenteil ist schon für die ersten meßbaren Veränderungen des Lösungszustandes der bestrahlten Eiweißlösungen, die uns in den ultramikroskopischen Untersuchungen *Wels'* (21) zugänglich sind und zu deren Auftreten nur Bruchteile der therapeutischen Strahlendosen erforderlich sind, der irreversible Charakter dieser Veränderungen wahrscheinlich geworden. Und die Beobachtungen über Umstellungen

des Elektrolytmilieus im bestrahlten Gewebe (s. S. 252) sprechen vielleicht in gleichem Sinne; ihre Nachhaltigkeit ist wohl in Zusammenhang zu bringen mit dauernden Veränderungen der Eiweißkörper in der Zellmembran und im Protoplasma, die ihrerseits die Grundlage der Änderungen der Dissoziationskonstanten und der Absorptionseigenschaften darstellen. Doch bedürfen diese Vermutungen noch der Bestätigung durch das Experiment. Übergangen seien hier die noch völlig hypothetischen Erwägungen über mögliche reversible Membranbeeinflussungen durch ungesättigte chemische Verbindungen, die als photolytische Abbauprodukte der Eiweißkörper oder der Lipoide unter Strahleneinwirkung entstehen und auf dem Säfteweg an die Zellmembranen auch nicht direkt strahlengetroffener Gewebe gelangen sollen. Die Versuche, die in dem vorausgegangenen Absatz besprochen und in Tabelle V berichtet sind, zeigen, daß selbst in Seren, die 5 Stunden lang mit großen Dosen Ultraviolettlichts bestrahlt waren, keine wirksamen Stoffe mit derartigen Eigenschaften angetroffen werden.

III. Besprechung der Ergebnisse.

Rückblickend kann als Ergebnis der mitgeteilten Versuche zusammengefaßt werden, daß an der röntgenbestrahlten überlebenden Hautmembran des Wasserfrosches eine Steigerung für Chlor und Traubenzuckerdurchlässigkeit nachweisbar wurde, verglichen mit der entsprechenden Durchlässigkeit der unbestrahlten Kontrollmembran. Die Durchlässigkeit für Chlor wurde auf das Ein- bis Fünffache, im Mittel auf das Dreifache der normalen Durchlässigkeit gesteigert. Die Steigerung ist in diesem Ausmaß nur an der in vivo bestrahlten Hautmembran vorhanden, in vitro bestrahlte Hautmembranen lassen eine Durchlässigkeitszunahme nur eben erkennen. Bestrahlte Seren und Hämoglobinlösungen haben keinen Einfluß auf die Chlordurchlässigkeit unbestrahlter Hautmembranen, oberflächenaktive Reaktionsprodukte des photochemischen Prozesses sind also mit dieser Versuchsanordnung nicht erfaßbar geworden.

Die Strahlen greifen bei dem gewählten Versuchsobjekt und der benutzten Röntgenstrahlung an Kern, Plasma und Zellmembran dieser mehrschichtigen Zellage in gleicher räumlicher Verteilung an. Ihre erste erkennbare Nachwirkung spielt sich jedoch, wie diese Versuche zeigen, fast ausschließlich an den Zellmembranen ab, deren gerichtete Permeabilität eine geringe, aber eindeutig nachgewiesene Steigerung erfährt. Daß Protoplasma und Kern um diese Zeit noch keine tiefgreifende Schädigung aufweisen, ergibt sich aus der Tatsache, daß die Absterbeerscheinungen an der bestrahlten Hautmembran nicht erkennbar früher einsetzen als an der unbestrahlten Kontrolle. Es scheint also der physikalisch-chemische Lösungszustand der Kolloide der Zellmembran auch am Froschhautmodell durch eine besondere

Empfindlichkeit ausgezeichnet zu sein. Der Aufbau der Plasmahaut aus verschiedenartigen Kolloiden, hydrophilen und hydrophoben Eiweißkörpern sowie Lipoiden, ist im einzelnen noch ungeklärt, und es kann im besonderen Falle dieser Röntgenversuche an der bestrahlten Froschhaut, wo aus physikalischen Gründen mit selektiver Strahlenabsorption einzelner Kolloide nicht zu rechnen ist, nicht entschieden werden, welcher Bestandteil der Plasmahautstruktur in seinem physikalisch-chemischen Lösungszustand am meisten strahlenempfindlich und so für die beobachtete Durchlässigkeitssteigerung von besonderer Bedeutung ist. In dieser Hinsicht ist eine Förderung unserer Kenntnisse am meisten zu erhoffen von Versuchen mit monochromatischem Licht und an roten Blutkörperchen, deren Eiweißkörper und Lipoide am besten untersucht sind und zu einem großen Teil in isoliertem und chemisch reinem Zustande entsprechenden Modellversuchen der Strahlenbeeinflussung unterworfen werden können. Versuche an kernhaltigen Zellen scheinen dann weiterhin geeignet, zunächst wenigstens für bestimmte Versuchsobjekte die Bedeutung des Strahleneinflusses auf Kern, Plasma, Membran innerhalb der Ganzheit der Strahlenschädigung der Zelle quantitativ abzugrenzen.

Zusammenfassung.

1. Röntgenstrahlen steigern die Chlor- und Traubenzuckerdurchlässigkeit der überlebenden Hautmembran des Wasserfrosches; die mittlere Steigerung beträgt 198%.

2. Der permeabilitätssteigernde Einfluß der Röntgenstrahlen ist bei Bestrahlung der Hautmembran in vivo wesentlich größer als bei Bestrahlung in vitro.

3. Bestrahlte Seren und Hämoglobinlösungen haben keinen Einfluß auf die Chlordurchlässigkeit unbestrahlter Hautmembranen.

Literatur.

1) *Heinicke*, Mitt. a. d. Grenzgeb. **14**, 21, 1905. — 2) *Hertwig*, Arch. f. mikroskop. Anat. **77**, 1, 1911. — 3) *Reiss*, C. r. soc. biol. **92**, 1403, 1925. — 4) *Strangeways* und *Oakley*, Proc. Roy. Soc. (B) **95**, 669, 1923. — 5) *Barr* und *Bovie*, Journ. of morphol. **38**, 295, 1923. — 6) *Nakashima*, Strahlentherapie **24**, 1, 1926. — 7) *Zülzer* und *Philipp*, Biolog. Zentralbl. **45**, 557, 1925. — 8) *Nadson* und Mitarbeiter, C. r. soc. biol. **94**, 249, 1926. — 9) *Tschohotine*, ebendaselbst **84**, 164, 1921. — 10) *Hoeber*, Phys. Chem. d. Zelle u. Gewebe, 5. Aufl. Leipzig 1922. — 11) *Michaelis*, Naturwissenschaften **14**, 33, 1926. — 12) *Liechti*, diese Zeitschr. **171**, 240, 1926. — 13) *Kroetz*, ebendaselbst **151**, 149 und 446, 1924; Klin. Wochenschr. **4**, 631, 1925. — 14) *Gans*, Strahlentherapie **18**, 655, 1924. — 15) *Lieber*, Verh. d.

Deutsch. Röntgengesellschaft **16**, 73, 1925. — 16) *Degkwitz*, Journ. f. Kinderheilkde. **37**, 27, 1924. — 17) *Pincussen*, diese Zeitschr. **161**, 68, 1925. — 18) *Kroetz*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **120**, 351, 1927. — 19) *Wertheimer*, Pflügers Arch. **189**, 383, 1923; Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethod. **5**, 2, 10, 1109. — 20) *Calvalasca*, Diss. Zürich 1913. — 21) *Neuberg*, diese Zeitschr. **29**, 279, 1910; **61**, 315, 1914; **67**, 59, 1914; **67**, 63, 1914. — 22) *Holthusen*, unveröffentlichte Versuche 1920. — 23) *Harris*, Biochem. Journ. **20**, 271, 280, 288, 1926. — 24) *Gaffron*, diese Zeitschr. **179**, 157, 1927. — 25) *Wels*, Pflügers Arch. 1928. — 26) *Holthusen*, Fortschr. auf d. Geb. der Röntgenstrahlen **29**, 777, 1922. — 27) *Kroetz*, diese Zeitschr. **137**, 372, 1923. — 28) *Derselbe*, Strahlentherapie 1928 (Sonderheft der 1. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Lichtforschung).

Zur Biochemie der Strahlenwirkungen.

VII. Mitteilung:

Der Röntgenstrahleneinfluß auf die Zusammensetzung künstlich gesetzter Peritonealflüssigkeit.

Von

Christian Kroetz.

(Aus der Medizinischen Klinik der Universität Greifswald.)

(Eingegangen am 1. Oktober 1927.)

Um einen Einblick in die durch Strahleneinfluß veränderte Durchlässigkeit der Zelle zu gewinnen, wurde es in den nachstehenden Untersuchungen unternommen, eine künstliche Gewebsflüssigkeit in eine der präformierten Gewebslücken, in die Bauchhöhle, zu bringen und den ablaufenden Austausch zwischen ihr und der Umgebung (Blut- und Endothelzellen der Serosa) vor und nach Strahleneinwirkung zu verfolgen. Könnten die Austauschvorgänge mit dem Blut als konstant betrachtet werden, so würde eine geänderte Zusammensetzung dieser künstlichen Gewebsflüssigkeit auf einen Wechsel im Stoffumsatz und Austausch der bestrahlten Zelle schließen lassen. Was den Bluteinfluß betrifft, so ist aus den umfangreichen Arbeiten über das Resorptionsproblem bekannt, daß Salzgehalt und osmotischer Druck der in die Leibeshöhle eingebrachten Lösungen auf Blutisotonie, vermutlich auch auf Blutisoionie gebracht werden und die Lösungen so der Resorption verfallen. Da ferner die Änderungen der chemischen Zusammensetzung des Blutes unter Strahleneinfluß, und zwar gerade für seinen Ionenbestand, durch bilanzmäßige Untersuchungen des Serums (*Kroetz*[1]) bei Menschen und Kaninchen untersucht sind, so scheint es möglich und nicht unberechtigt, Abweichungen der Zusammensetzungsänderung in der Peritonealflüssigkeit von der Richtung und vom Ausmaß der strahlenbewirkten Blutveränderungen in Zusammenhang zu bringen mit einer geänderten Durchlässigkeit der unmittelbar an die künstliche Gewebsflüssigkeit angrenzenden Endothelzellen des Bauchfells.

[1] *Kroetz*, diese Zeitschr. 151, 149 und 446, 1924.

Methodik.

Die Versuche wurden meist an Kaninchen, teilweise an Meerschweinchen durchgeführt. Nach Rasieren der Bauchhaut und punktförmiger Durchtrennung der Haut- und Muskelschicht mit dem Messer wird mit einer 1,5 mm dicken Hohlnadel, die vorn rund zugeschliffen und verschlossen ist und zwei seitliche Öffnungen trägt, bei den 1900 bis 2400 g schweren Kaninchen eine Menge von 200 und 300 ccm Normosallösung bzw. isotonischer Traubenzuckerlösung (4,4%) intraperitoneal infundiert; Meerschweinchen mit etwa 300 g Gewicht erhielten 30 ccm. Nach 3 bis 4 Stunden wurde mit derselben Nadel die Bauchhöhle punktiert, die intraperitoneale Flüssigkeit tropfte dann bei sanfter Eindrängung der seitlichen Abschnitte des Abdomens ziemlich rasch aus der Nadel ab und konnte unter Paraffin aufgefangen werden. Vom Beginn der Infusion an bis zur Entnahme des Peritonealinhalts waren die Tiere auf dem Kaninchenbrett festgebunden; der störende Einfluß von Bewegungen auf die Resorption war damit unterdrückt. Der Eingriff selbst wurde unter sterilen Kautelen vorgenommen; niemals kam es zu einer Infektion des Bauchfells; auch Verletzungen des Darms sind, wie die späteren Autopsien ergaben, nie gesetzt worden. Die späteren Infusionen wurden zu verschiedenen in den Tabellen angegebenen Zeiten, jedoch nie vor 24 Stunden vorgenommen. Um diese Zeit war die am Vortag infundierte Menge restlos resorbiert. Die verwendete Röntgenstrahlung umfaßte einen möglichst großen Spektralbereich (nur Pappfilterung); härteste Strahlen fehlten; Grenzwellenlänge 110 kV effektiv. Die Dosis, mit der die Tiere belegt wurden, betrug nach Ionisationsmessungen mit dem Siemensdosismesser acht bis zehn menschliche Hauteinheitsdosen. Sie führte am vierten bis sechsten Tage zur leichten Schuppung der obersten Epidermisschicht und am vierten bis neunten Tage zum Tode des Tieres (ausnahmsweise zweimal schon am ersten und zweiten Tage). Die chemischen Analysen wurden nach den früher besprochenen[1] Methoden ausgeführt.

Die Tabelle I gibt in den Nummern 1 bis 7 die gewonnenen Resultate wieder, für die anorganischen Ionen in Millimolen, für die Aminosäuren[2] in Milligrammen ausgedrückt, je für 100 ccm Peritonealinhalt.

Versuchsergebnisse.

Erfaßt werden in den Versuchen nur Querschnitte durch zwei interferente Vorgänge, den Ionenaustausch in die künstliche Gewebsflüssigkeit hinein und den entgegenlaufenden Resorptionsprozeß, der seinerseits auf möglicherweise sehr verschiedenen Partialabläufen für Lösungsmittel und gelöste Substanzen zusammengesetzt ist.

Trotzdem ergab sich, wie eine Durchsicht der Tabelle I zeigt, sowohl bei einem und demselben Tiere als im Vergleich der Tiere untereinander eine recht befriedigende Konstanz der Resultate. Die Wiederholung der Infusionen in die Bauchhöhle setzte als solche keine Veränderung des Reaktionsablaufs, wie das die am Tiere Nr. 2 und 3 ausgeführten Vorversuche zeigen (Tabelle I, 1a bis c, 2a und b). Sie stehen im Einklang mit Befunden *Cunninghams*[3], der für die Resorption hypotonischer Dextroselösungen feststellte, daß selbst täglich ausgeführte Infusionen, die längere

---

[1] *Kroetz*, diese Zeitschr. **151**, 149, 1924.

[2] *Folin*, Journ. biol. Chem. **51**, 377, 1922.

[3] *Cunningham*, The Amer. Journ. of phys. **53**, 488, 1920.

Tabelle I.

Nr.	Datum	Tier	Infundierte Menge	Entnahme nach Std.	Na	K	Ca	Cl	HCO_3	$H_2PO_4 + HPO_4$	Anionendefizit	Aminosäuren	Eiweiß relativ
1. a)	23. V.	2. Kaninchen	300 Normosal	3½	140,0	5,6	4,2	103,0	19,6	2,0	25,2	5,2	100
b)	25. V.		300 „	3	141,7	4,8	4,6	104,0	18,2	1,9	27,0	4,7	112
c)	29. V.		300 „	3	138,7	4,8	4,0	102,0	19,9	1,8	23,8	5,0	—
d)	3. VI.		300 Traubenzucker	3	85,8	5,8	3,9	53,0	15,6	1,5	25,4	5,5	104
	4. VI.	Bestrahlung											
e)	4. VI.		300 „	3	89,5	5,5	3,1	63,0	14,9	3,0	27,2	9,3	141
f)	7. VI.		300 „	3	91,3	6,3	3,2	49,0	14,5	2,8	34,5	8,3	171
	7. VI.	Exitus											
2. a)	25. V.	3. Kaninchen	300 Normosal	3	131,7	5,0	4,2	102,0	18,7	1,0	19,2	4,3	100
b)	28. V.		300 „	3	129,1	4,9	4,3	101,5	18,4	1,2	17,2	4,1	100
	28. V.	Bestrahlung											
c)	28. V.			(5)	129,1	3,7	5,5	95,5	14,7	1,5	26,6	5,8	218
d)	30. V.		300 „	3	135,2	6,0	4,7	92,0	18,2	1,6	34,1	5,3	186
e)	6. VI.		300 Traubenzucker	4	87,8	5,7	3,5	41,0	13,0	1,9	41,1	7,1	194
3. a)	27. V.	4. Kaninchen	300 Normosal	3	145,2	4,6	4,6	98,0	20,1	2,0	34,3	4,3	100
	28. V.	Bestrahlung											
b)	28. V.		300 „	3	148,7	3,9	4,4	96,0	20,3	3,0	37,7	5,5	312
	1. VI.	Exitus											

Tabelle I (Fortsetzung).

Nr.	Datum	Tier	Infundierte Menge	Entnahme nach Std.	Na	K	Ca	Cl	HCO_3	$H_2PO_4 + HPO_4$	Anionendefizit	Aminosäuren	Eiweiß relativ
4. a)	3. VI.	6. Kaninchen	200 Traubenzucker	3	92,1	4,7	2,6	50,0	16,2	1,0	32,1	3,3	100
	4. VI.	Bestrahlung											
b)	4. VI.		200 „	3	94,3	4,4	2,4	49,0	14,8	1,3	36,0	6,1	146
	4. IV.	Exitus											
5. a)	5. VI.	8. Kaninchen	200 „	4	94,4	5,3	4,0	56,0	17,4	1,7	28,6	5,5	100
	6. VI.	Bestrahlung											
b)	6. VI.		200 „	4	96,1	4,9	4,2	54,0	17,2	2,3	31,7	7,3	195
	7. VI.	Exitus											
6. a)	8. IV.	9. Kaninchen	200 „	$4^1/_2$	61,9	4,6	3,6	52,0	15,0	0,5	2,6	4,2	100
	9. VI.	Bestrahlung											
b)	9. VI.		200 „	$4^1/_2$	66,5	4,2	3,8	45,0	13,5	1,5	14,5	6,9	208
	12. VI.	Exitus											
7.	23. V.	Bestrahlung	(kein Vorversuch)										
a)	23. V.	1. Kaninchen	300 Normosal	$3^1/_2$	158,2	4,7	4,9	104	19,1	2,3	—	5,7	—
b)	25. V.		300 „	$3^1/_2$	154,8	4,7	5,5	115	18,0	—	—	7,6	—
	4. VI.	Exitus											

Zeit fortgesetzt wurden, die Resorption des Traubenzuckers (die nach 12 Stunden restlos beendet war) nicht beeinflußt. Wenn ein solches Ergebnis vielleicht bei den Normosalversuchen (Tier Nr. 2, 3 und 5) verständlich erscheint wegen der Äquilibrierung der eingebrachten Flüssigkeit, so ist es doch bemerkenswert in den Traubenzuckerversuchen, in welchen die Herstellung eines Ausgleichs mit beträchtlichen Stoffbewegungen des Gesamtkörpers einhergeht. Aber auch bei den Normosalversuchen sind Ionenverschiebungen zu erwarten. Die Ionenkonzentrationen des Normosals, wenigstens in den für die Infusion fertigen Lösungen, war nämlich nicht ganz blutgleich. Die Normosallösung ist sehr schwer klar zu gewinnen, oft bildete sich in der leicht opaleszenten, vorsichtig geschwenkten und spontan abgekühlten Lösung ein Bodensatz von Calciumcarbonat. Er wurde unter sterilen Bedingungen abfiltriert, und in dem Filtrat wich nun die Konzentration des Calciums und Bicarbonats ab vom Serumspiegel des normalen Kaninchens, welcher von dem des Menschen nur durch leicht erhöhte Calciumwerte (11 bis 13 mg-% statt 9 bis 11 mg-%) unterschieden ist. Die einzelnen Normosallösungen hatten die in Tabelle II verzeichneten Konzentrationen. Der Körper hat also, um einen Ausgleich herzustellen, auch bei der Normosalinfusion gewisse Ionen in die künstliche Gewebsflüssigkeit abzugeben. Wesentlich größer sind die Salzbestände, die er in den Traubenzuckerinfusionen verliert.

Tabelle II.

(Werte in Milligrammprozenten angegeben.)

Nr.	Na	K	Ca	Cl	HCO_3	$(H_2PO_4 + HPO_4)$
1	343	12,35	6,8	376,3	Spuren	3,78
2	348	11,36	4,9	351,4	0	3,80
3	—	11,50	5,7	355,0	0	4,03
4	346	11,90	6,9	358,5	Spuren	3,21
Mittel:	345,6	11,78	6,07	360,3	0	3,70

Der Vergleich der Austauschvorgänge (Tabelle III) vor und nach der Bestrahlung ergibt im einzelnen folgendes Bild. Das Natrium nimmt zu. Das Chlorid und das Bicarbonat fällt ab; während diese Bewegungen sowohl am Bestrahlungstag als später, nach 2, 3 und 6 Tagen, sich gleichgerichtet verhalten, ergibt sich für Kalium und Calcium in den hier berichteten Versuchen eine differente Bewegung: am ersten Tage K-Verminderung und Ca-Vermehrung; am zweiten, dritten und sechsten Tage hingegen umgekehrt, K-Anstieg und Ca-Senkung. Ungewöhnlich groß sind die Steigerungen des Gehalts an anorganischem Phosphat und an Aminosäuren in der Peritonealflüssigkeit nach der Bestrahlung; die Phosphate haben nach 4 bis 6 Stunden um 57,8%, nach 48 bis 144 Stunden um 76,2% zugenommen und der Aminosäurenanstieg beträgt zu den genannten Zeiten 48 bzw. 94%.

Die ermittelten Werte wiederholen also in groben Zügen das Bild der Änderungen, welche der Blutspiegel nach den früher berichteten Versuchen unter Strahleneinwirkung erfährt, und stellen so eine Bestätigung des damals Gefundenen dar. Leider konnten bei den Kaninchen dieser Versuche die gleichzeitigen Serumwerte der vorstehend berücksichtigten Stoffe nicht

Tabelle III.

(Mittelwerte, ausgedrückt in Millimolen.)

	Vor Bestrahlung	Nach Bestrahlung		Spätstadium nach Bestrahlung	
		Absolut	Differenz	Absolut	Differenz
Na (Normosal)	137,15	139,1	+ 1,95	—	—
Na (Traubenzucker) . . .	84,55	86,6	+ 2,05	—	—
K	4,82	4,6	— 0,22	6,15	+ 1,33
Ca	3,82	3,9	+ 0,08	3,35	— 0,47
Cl (Normosal)	99,70	95,65	— 4,05	—	—
Cl (Traubenzucker) . . .	52,75	50,25	— 2,50	—	—
			— 1,22		
HCO_3	17,12	15,90	— 46	16,35	— 0,77
$H_2PO_4 + HPO_4$	1,33	2,10	+ 0,77	2,35	+ 1,02
Anionendefizit in % . . .	23,30	29,99	—	34,30	—
Anionendefizit, Steigerung in %	—	—	28,3	—	46,8
Quotient $\frac{K \cdot P}{Ca}$	1,678	2,476	—	4,314	—
Aminosäuren	4,48	6,65	+ 2,17	8,7	+ 4,22
Eiweiß, relativ	100	203,3	—	184,5	—

gleichzeitig ermittelt werden, da die erforderlichen Blutentnahmen von etwa 20 ccm bei einer Gesamtblutmenge von etwa 200 ccm einen erheblichen Aderlaß bedeuten und die starken Wirkungen des letzteren auf den Wasser- und Salzgehalt des Blutes wohl bekannt sind[1]. So war der Weg des direkten Vergleichs nicht möglich. Indirekt ergibt sich aber aus den früheren Blut- und jetzigen Peritonealflüssigkeitswerten, daß die Intensität der Ausschläge für alle Werte und für ihr Verhältnis untereinander mit Ausnahme derjenigen der Phosphate und Aminosäuren ungefähr gleichartig ist.

Für die beiden letztgenannten Stoffe scheint somit jene eingangs gestellte Forderung erfüllt: stärkere Zunahme in der künstlichen Gewebsflüssigkeit als im Blute. Da eine Speicherung in der ersteren nicht in Betracht gezogen zu werden braucht, so dürfte die Berechtigung gegeben sein zu der Deutung, daß die ungewöhnliche Zunahme der Phosphate und Aminosäuren in der künstlichen Peritonealflüssigkeit auf vermehrten Austritt aus den Endothelzellen des Peritoneums zu beziehen ist.

Daran läßt sich die Erörterung knüpfen, ob die relative Eiweißzunahme um 103,3% am Bestrahlungstag bzw. 84,5% im Spätstadium, wie sie in der Peritonialflüssigkeit zu beobachten ist, desgleichen aus Eiweißbeständen der Zelle zu erklären ist oder einer erhöhten Gefäßdurchlässigkeit zugeschrieben werden muß. Die chemische Zusammensetzung dieses Eiweißes ist zur Entscheidung dieser Frage nicht zu verwerten. Es besteht sowohl vor als nach der Bestrahlung vorwiegend aus Globulinen, wie sich aus seiner Salzfällbarkeit mit verschieden konzentrierten Ammonsulfatlösungen ergibt, wenn auch bei dem außerordentlich geringen absoluten Eiweißgehalt die verwendete nephelometrische Methode nur qualitative, nicht mehr einwand-

[1] *Endres*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 48, 694, 1926.

freie quantiative Ablesungen gestattete. Der absolute Eiweißgehalt war so gering, daß Refraktionsbestimmungen nicht verwertbar waren, vielmehr eine nephelometrische Methode von *Rona* und *Kleinmann*[1] verwendet wurde, welche allerdings nur relative Werte ergibt. (Als Vergleichslösung diente eine nach diesen Autoren als konstant und als innerhalb der gegebenen Zeit stabil zu betrachtende Verdünnung von Serum mit isotonischer Kochsalzlösung unter Thymolzusatz. Die gewonnenen Werte entstammen Doppelbestimmungen, welche stets sehr gut übereinstimmten.) Obwohl nach makroskopischen Beobachtungen von *Siedamgrotzky*[2] im bestrahlten Hautbereich bei ringerdurchströmten Kaninchen eine erhöhte Kapillardurchlässigkeit besteht, kann die Frage nach der Herkunft der Eiweißzunahme doch nicht eindeutig auf vermehrten Durchtritt aus den Gefäßen bezogen werden, da man nach der Einwirkung einiger oberflächenverdichtender Stoffe auf Zellgrenzschichten[3] in den letzteren ebenfalls globulinartige Eiweißkörper vermutet hat.

Nicht übergangen werden soll endlich der Unterschied in der K- und Ca-Bewegung nach Strahleneinfluß, welcher zwischen den Befunden in der Peritonealflüssigkeit und den früheren Befunden im Blute besteht. Da gleichzeitige Untersuchungen im Blute aus den erwähnten Gründen in den hier vorliegenden Versuchen nicht angestellt werden konnten, so ist die gegensätzliche Bewegung im Anfangsstadium (4 bis 6 Stunden) schwer zu beurteilen (im Spätstadium herrscht Übereinstimmung).

Wertvoll erscheint noch die Bestätigung zweier weiterer früher mitgeteilter Befunde, der Zunahme des Anionendefizits und des Quotienten $K \times P/Ca$ unter Strahleneinfluß. Das Anionendefizit in der Peritonealflüssigkeit steigt zunächst um 28,3%, später (kurz vor dem Tode) um 46,8% des Wertes der Vorperiode an. Recht groß und ausschlaggebend beeinflußt durch den starken Anstieg des Phosphatgehalts, der die Annahme eines gesteigerten Phosphataustritts aus den Endothelzellen des Bauchfells nahelegte, ist die Steigerung des Ionenquotienten $K \times P/Ca$; sie beträgt 47,6 bzw. 157,1%, wobei der letztere Wert kurz vor dem Tode beobachtet ist. Die Deutung des Anionendefizits ist noch zu keinem Abschluß gelangt; es weist auf die Anwesenheit saurer Valenzen im Serum hin, die nach der üblichen Auffassung zum großen Teil durch die bei Blutreaktion negativ geladenen Serumeiweißkörper, zum anderen Teil durch noch unbekannte organische Säuren abgesättigt sind. Gerade durch eine Zunahme des Bilanzanteils dieser unbekannten organischen Säuren scheint die Steigerung des Anionendefizits unter Strahleneinfluß verursacht zu sein. Dafür spricht der Befund, daß solche unbekannten organischen Säuren in vitro bei Bestrahlungen von Eiweißkörpern zuerst von *Neuberg*[4] entdeckt und seitdem regelmäßig gefunden worden sind (*Mond, Fernau* und *Pauli, Wels*), wenngleich es bisher nicht immer gelungen ist, ihre chemische Konstitution zu klären. Für einen engen Zusammenhang der aus Bilanzuntersuchungen des Serums zu schließenden unbekannten sauren Valenzen mit den Eiweißen spricht auch alles, was bisher zur Kenntnis der vermehrten endogenen Säurebildung bei Nierenleidenden[5] und Pneumonie-

---

[1] *Rona* und *Kleinmann*, diese Zeitschr. **140**, 462, 1924.
[2] *Siedamgrotzky*, Strahlentherapie **19**, 74, 1925.
[3] *Hoeber*, Pflügers Arch. **199**, 1923.
[4] *Neuberg*, diese Zeitschr. **13**, 314, 1908.
[5] *H. Straub* und *Kl. Meier*, diese Zeitschr. **124**, 259, 1921.

kranken[1] beigetragen worden ist. Besonders lehren dann die letzten Untersuchungen (*H. Straub* und *Kl. GollwitzerMeier*[2]) über Vergiftungen mit dem protoplasmazerstörenden Sublimat die ausschlaggebende Bedeutung des Eiweißumbaues und -abbaues für die Entstehung des Anionendefizits und des Molenrestes (*H. Straub*[3]). Aus diesen Untersuchungen geht außerdem noch die Möglichkeit beträchtlicher Kationendefizite hervor, die von den letztgenannten Autoren mit dem Auftreten aminartiger Verbindungen erklärt wird. Alle diese Befunde sind also gut vereinbar mit der früher vorgetragenen Auffassung[4], daß die Änderungen des Anionendefizits im Serum bestrahlter Tiere und Menschen zu beziehen sind auf Reaktionsprodukte der Strahlendenaturierung des Eiweißes.

Zusammenfassung.

In eine künstliche Gewebsflüssigkeit, die durch Einbringung von Normosal bzw. Ringerlösung in die Bauchhöhle von Kaninchen hergestellt wird, treten bei ein und demselben Tiere nach ausgiebiger Röntgenbestrahlung des Abdomens mehr Globuline, Aminosäuren und Phosphate über als vor der Bestrahlung. Es wird wahrscheinlich gemacht, daß dieser Mehrdurchtritt, der die entsprechenden Veränderungen im Blutspiegel dieser Stoffe stark übertrifft, zu gelten hat als Ausdruck vermehrter Durchlässigkeit der Endothelzellen des Bauchfells, die an die künstliche Gewebsflüssigkeit angrenzen.

---

[1] *H. Straub*, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilkde. **25**, 1, 1924; Verh. d. Deutsch. Kongr. f. inn. Med. 1925.

[2] *H. Straub* und *Kl. Gollwitzer-Meier*, Deutsch. Med. Wochenschr. **51**, 642, 1925.

[3] *H. Straub*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **142**, 145, 1923.

[4] *Kroetz*, diese Zeitschr. **151**, 146 und 449, 1924; Ergebn. d. med. Strahlenforschung **2**, 351, 1926.

Untersuchungen über den Alkoholumsatz beim Menschen.

Von

A. Bornstein (Hamburg) und **A. Loewy** (Davos).

(Aus dem Schweizerischen Forschungsinstitut in Davos und dem Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg.)

(Eingegangen am 10. Oktober 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Wenn auch unser Wissen über das Schicksal des Alkohols im tierischen und menschlichen Körper durch die sehr zahlreichen und vortrefflichen Arbeiten, die sich mit der Stellung des Alkohols im Stoffwechsel beschäftigen, recht abgerundet erscheint[1], so bleiben doch noch einige Unsicherheiten. Sie rühren daher, daß die bisherigen Untersuchungen gewöhnlich nur *eine* Seite des Problems umfaßten, indem sie entweder den Einfluß auf den respiratorischen Stoffwechsel in Betracht zogen oder das Verhalten im Blut oder in den Organen zum Gegenstand haben. Dagegen fehlt es bis jetzt an Untersuchungen, in denen gleichzeitig die Beeinflussung des Stoffwechsels und das Verhalten des Alkohols im Blute in längeren Perioden bestimmt wurden. Unser Plan ging deshalb dahin, diese Lücke auszufüllen. Zu diesem Zweck haben wir vergleichend den Ablauf des Gaswechsels und den Gang des Alkoholgehaltes des Blutes nach Aufnahme bestimmter Alkoholmengen festgestellt, und zwar fortlaufend so lange, bis kein Alkohol mehr im Blute nachzuweisen war und der Gaswechsel eine Rückkehr zur Norm erkennen ließ.

Methode.

Wir gingen folgendermaßen vor: Der Gaswechsel wurde an den Versuchspersonen, deren vier uns zur Verfügung standen, zunächst im nüchternen Zustande, d. h. etwa 11 bis 13 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme, früh morgens in zwei unmittelbar aufeinander folgenden Versuchen bestimmt. Wir benutzten dazu das *Zuntz-Geppert*sche Verfahren, das uns auch heute

[1] Die Literatur bis in die neueste Zeit ist in ausgezeichneter Weise von *Rosemann* in Oppenheimers Handb. d. Biochem. 8, 2. Aufl. zusammengestellt worden, so daß wir auf sie nicht weiter einzugehen brauchen.



noch sicherer und aufschlußreicher erscheint als die modernen Apparate für kurzfristige Gaswechselbestimmungen. Dann wurden 25 bis 30 g absoluten Alkohols mit Wasser auf 100 ccm verdünnt und, mit einer Spur Vanillin schmackhaft gemacht, zugeführt, und nun in Zwischenräumen von $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde weitere Bestimmungen des Gaswechsels vorgenommen. In den späteren Versuchen wurde aus im folgenden ersichtlichen Gründen außer Alkohol auch Zucker zugeführt. In diesem Falle wurde so verfahren, daß zunächst zwei nüchterne Respirationsversuche gemacht wurden, worauf die Versuchsperson 25 g Rohrzucker mit Wasser und etwas Citronensaft auf 50 ccm aufgefüllt erhielt. Nach 1 Stunde wurde die gleiche Rohrzuckergabe wiederholt, nach $\frac{1}{2}$ Stunde dieselbe Rohrzuckermenge mit 25 bzw. 30 g Alkohol abs. in Wasser auf 100 ccm aufgefüllt, gegeben. Es folgten dann weitere 25 g Rohrzucker (immer auf 50 ccm aufgefüllt) bis zum Ende des Versuchs. Da die Versuche meist 7 Stunden dauerten, wurden so außer dem Alkohol noch $7 \times 25 = 175$ g Rohrzucker zugeführt. Zwischendurch wurde in einhalb- bis einstündigen Zwischenräumen der Gaswechsel bestimmt. In den ersten Versuchen war Lävulose an Stelle des Rohrzuckers verabfolgt worden; doch verursachte der Fruchtzucker in so großen Dosen meist beträchtliches Übelkeitsgefühl, so daß wir bald zum Rohrzucker übergingen.

Während der sich 7 Stunden ausdehnenden Versuchsreihe blieben die Versuchspersonen im übrigen nüchtern, d. h. sie erhielten außer den in den Protokollen angegebenen Alkohol- und Zuckermengen keinerlei Nahrung.

Die Alkoholmengen, die wir unseren Versuchspersonen gaben, waren mit Absicht wesentlich kleiner gewählt als bei manchen an Tieren angestellten Untersuchungen (*Völtz, Gréhant, Biehler* usw.), weil wir Wert darauf legten, die Personen im leidlich koordinierten Zustande eines nur geringen Rausches zu erhalten. Das war erforderlich, weil wir gleichzeitig eine Reihe von Ergogrammen aufschreiben ließen. Auch schien uns die Möglichkeit geordneter Respirationsversuche im Stadium des sinnlosen Rausches nicht vorzuliegen.

Zugleich wurde unmittelbar nach jedem Respirationsversuch der Alkoholgehalt des Blutes nach der Methode von *Widmark* ermittelt. Die Methode ergab uns in Kontrollen mit Zusatz bekannter Alkoholmengen zuverlässige Werte. Bei Serienbestimmungen ist allerdings darauf zu achten, daß die über der Bichromatmischung hängenden Blutproben nicht länger als 2 Stunden aufbewahrt bleiben dürfen. Es werden sonst offenbar andere flüchtige Stoffe aus dem Blute frei, die ähnlich wie Alkohol auf die Bichromatmischung wirken.

Die Blutentnahme geschah aus dem Ohrläppchen mit den von *Widmark* angegebenen Kapillarröhrchen, wobei die Blutmenge mittels der Torsionswage festgestellt wurde. Bei einiger Übung gelingt es leicht, Entnahme und Wägung so schnell auszuführen, daß keine Gerinnung in der Zwischenzeit eintritt, vorausgesetzt, daß das Blut in genügend großen Tropfen schnell aus der Wunde austritt. Stets wurden drei Blutproben entnommen, deren Analyse innerhalb der von *Widmark* angegebenen Grenzen eine befriedigende Übereinstimmung zeigte, und aus denen ein Mittelwert berechnet wurde.

Unsere Versuche sind an den folgenden drei Versuchspersonen ausgeführt worden:

1. Prof. *Ad. Loewy*, 64 Jahre alt, 60 kg, seit 40 Jahren als Versuchsobjekt an Respirationsversuche gewöhnt.

2. Prof. *A. Bornstein*, 45 Jahre alt, 83 kg, seit 25 Jahren an Respirationsversuche gewöhnt.

3. Frl. *J. Heyer*, 29 Jahre alt, 51,9 kg, war kurz vor Beginn der Versuche an den *Zuntz-Geppert*schen Apparat gewöhnt worden. Sie lieferte bald bemerkenswert gleichmäßige Werte.

Für einige Vorversuche war noch herangezogen worden:

4. Dr. *C. Schirlitz*, 25 Jahre alt, 76,5 kg. Er war seit einem Jahre häufig das Objekt von Respirationsversuchen gewesen.

Sämtliche Versuchspersonen genießen nur gelegentlich Alkohol in mäßigen Mengen, Dr. *Schirlitz* ist Abstinent.

Ergebnisse.

1. Verhalten des Alkohols im Blute.

Fast alle Versuche, in denen der Alkoholgehalt des Blutes bestimmt wurde, waren so angelegt, daß stündlich 25 g Rohrzucker in einer abgemessenen Menge Wasser 7 Stunden gegeben wurden und bei der dritten Rohrzuckergabe gleichzeitig 25 bis 30 g Alkohol in der oben genannten Verdünnung verabfolgt wurden (s. S. 272).

Nach Verabfolgung des Alkohols steigt der Alkoholgehalt des Blutes sehr schnell an, um meist nach etwa einer halben Stunde, in selteneren Fällen erst nach 1 Stunde das Maximum zu erreichen. Im Mittel aller Versuche lag, wie Abb. 1 erkennen läßt, das Maximum bei allen 3 Versuchspersonen nach 30 Minuten. Es stieg bei den verschiedenen

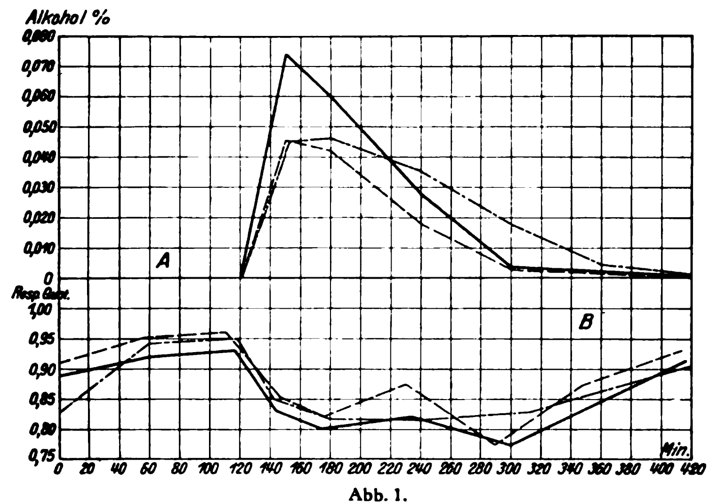


Abb. 1.
A = Alkoholgehalt des Blutes in $^0/_0$. *B* = Respiratorischer Quotient.
—— *Loewy*. ----- *Bornstein*. - · - *Heyer*.

Versuchspersonen verschieden hoch, wie folgende kleine Tabelle zeigt, die das Mittel der Maxima an jeder Person wiedergibt:

Tabelle I.

Person	Verabfolgte Alkoholmenge pro kg Körpergewicht g	Maximaler Alkoholgehalt des Blutes °/₀	Zeit bis zum Verschwinden des Alkohols aus dem Blute Std.
Loewy	0,50	0,074	3
Frl. *Heyer* . . .	0,47	0,049	4
Bornstein . . .	0,36	0,050	3

Ein gewisser Einfluß der pro Körperkilogramm verabfolgten Alkoholmenge läßt sich nicht leugnen, insofern als *Loewy*, der die größten Alkoholmengen erhielt, auch die höchsten Alkoholwerte im Blute hatte. Auffallend ist dagegen, daß Frl. *Heyer* und *Bornstein*, die recht verschiedene Alkoholmengen zu sich nahmen, trotzdem den gleichen Maximalwert erreichen. Individuelle Momente spielen also zweifellos noch mit.

Der Abfall vom Maximum gestaltet sich nun verschieden. Während die Kurve bei *Loewy* sofort wieder abfällt, bleibt sie bei *Bornstein* und namentlich bei Frl. *Heyer* noch ½ Stunde lang auf merklich der gleichen Höhe, so daß sich in diesen Fällen ein gewisses Plateau ausbildet, auf das *Gréhant*[1] zuerst aufmerksam gemacht hat. Das Plateau ist aber auch bei Frl. *Heyer* weniger stark ausgesprochen als in *Gréhants* Versuchen, was wohl darauf zurückzuführen ist, daß *Gréhant* die doppelten bis vierfachen Alkoholmengen anwendete.

Der weitere Ablauf ging so vor sich, daß in wenigen Stunden der Alkohol aus dem Blute verschwunden war. Nimmt man an, daß ein Alkoholgehalt des Blutes von 0,004 % fast noch innerhalb der Fehlergrenze liegt, so waren (s. Abb. 1) schon nach 3 bis 4 Stunden bei allen drei Versuchspersonen nur noch kaum nachweisbare Spuren von Alkohol im Blute. 1 Stunde später waren auch diese Spuren nicht mehr zu finden. Daß bei größeren Alkoholmengen der Alkohol längere Zeit im Blute verweilt, wie es von früheren Autoren oft gefunden, erscheint erklärlich[2].

Bemerkenswert ist ein Versuch an *Bornstein* vom 13. Juni 1927, in dem die gleiche Alkoholmenge in der gleichen Verdünnung gegeben wurde,

[1] *Gréhant*, Journ. de Phys. et Path. gén. 1907, S. 978.
[2] Siehe z. B. *Gréhant*, l. c.

in dem aber überhaupt kein Zucker verabfolgt war. Auch in diesem Falle stieg der Alkohol im Blute nach ½ Stunde auf ein Maximum, das mit 0,047 % absolut mit dem Mittel von 0,050 % in den Rohrzuckerversuchen übereinstimmte. Der Abfall dauerte allerdings etwas länger und war erst nach 6 Stunden beendet.

Im gleichen Versuche hatten wir neben dem Alkoholgehalt des Blutes auch den des Urins bestimmt, und zwar betrug nach der Alkoholgabe in den ersten 2 Stunden: Mittlerer Alkoholgehalt des Blutes 0,034 %, des Urins 0,036 %; in den folgenden 3 Stunden: Mittlerer Alkoholgehalt des Blutes 0,020 %, des Urins 0,005 %.

In den ersten 2 Stunden war also der Alkoholgehalt des Urins von der gleichen Größenordnung wie der des Blutes. Das entspricht durchaus den Befunden, die *Miles*[1] erhoben hat. Später jedoch verschwindet der Alkohol bis auf Spuren aus dem Urin, während im Blute noch beträchtliche Mengen Alkohol nachweisbar sind. Da *Miles* seine Versuche nicht über 2 Stunden ausdehnte, ist ein tatsächlicher Widerspruch unserer Beobachtung gegenüber nicht vorhanden.

Dem höchsten Anstieg von 0,045 bis 0,075% Alkohol im Blute entspricht psychisch eine gewisse Benommenheit, fröhliche Stimmung und Gesprächigkeit bei der Unterhaltung. Überließ man die Personen sich selbst, so schliefen sie sehr schnell ein. Die Erscheinungen gingen dabei jedoch nie so weit, daß die Personen sich an den Handgriffen, die zur Durchführung der Versuche nötig waren, nicht hätten beteiligen können. Wenn nach 2 Stunden der Blutalkohol auf im Mittel 0,025 % gesunken war, war das psychische Verhalten wieder völlig normal.

2. *Erhaltungsumsatz.*

In den älteren Versuchen, in denen Alkoholmengen gegeben wurden, die der Größenordnung nach unseren Dosen entsprachen, fand sich stets ein Gleichbleiben des O_2-Verbrauchs innerhalb der Fehlergrenzen, so namentlich in den Versuchen von *Zuntz* und *Berdet*[2] und von *Geppert*[3] (*Rosemann*, S. 509). Nur *Simonson*[4], der sehr viel kleinere Dosen gab als wir — nur 2 bis 4 g —, findet ein Ansteigen des Kalorienbedarfs um etwa 5 %, bei einer anderen Versuchsperson um etwa 10 % im Mittel. Leider geht aus *Simonsons* Arbeit nicht hervor, wann nach der Alkoholzufuhr die Respirationsversuche angestellt wurden und auf wie lange

[1] *Miles*, Journ. of Pharm. and exper. Therap. **20**, 265, 1922. Vgl. auch *Widmark*, Skand. Arch. **33**, 85, 1915.
[2] *Zuntz* und *Berdet*, Fortschr. d. Med. **5**, 1, 1887.
[3] *J. Geppert*, Arch. f. exper. Pathol. **22**, 367, 1887.
[4] *Simonson*, ebendaselbst **120**, 259, 1927.

Zeit sie sich erstreckten; nur ist seinen Tabellen zu entnehmen, daß Nüchtern- und Alkoholversuche nicht am gleichen Tage ausgeführt wurden. Ersichtlich ist auch nicht, wie die Kalorien aus dem Respirationsversuch berechnet wurden.

Der kalorische Wert des verbrannten Alkohols wurde bei uns aus O_2-Verbrauch und Respirationsquotient (R.-Q.) folgendermaßen berechnet: 1 Liter O_2 entspricht einer Produktion von 4,848 Cal bei reiner Alkoholverbrennung. Verbrennt eine Mischung von Kohlehydrat (K.-H.) und Fett mit dem R.-Q. 0,84, so würde der dabei verbrauchte O_2 den gleichen kalorischen Wert haben wie bei reiner Alkoholverbrennung, wie aus der bekannten Tabelle von *Zuntz* und *Schumburg* hervorgeht[1]. Nimmt man die Fehlerbreite eines Respirationsversuches zu mindestens $\pm 2\%$ an, so geht aus der gleichen Tabelle hervor, daß Schwankungen des R.-Q. zwischen 0,78 und 0,90 für die Berechnung praktisch ohne Bedeutung sind, d. h. daß man bei solchen Schwankungen Kalorienproduktion und O_2-Verbrauch proportional setzen kann. Eine Berücksichtigung des N-Umsatzes spielt, wie schon *Tögel*, *Brezina* und *Durig*[2] in Bestätigung einer Angabe von *Magnus-Levy* zeigten, keine Rolle für das rechnerische Ergebnis. Am einfachsten gestaltet sich daher die Betrachtung, wenn nach Alkoholaufnahme der R.-Q. in den genannten Grenzen liegt.

Dieser Bedingung entsprechen zwei unserer ohne Zuckergaben durchgeführten Alkoholversuche an *Schirlitz* vom 6. März 1926 und 9. März 1926[3]. Im ersten dieser Versuche sind die Schwankungen der R.-Q. nur 0,05, die des O_2-Verbrauchs 2% nach oben und 3% nach unten. Die Kalorienproduktion ist also durch den Alkohol nicht beeinflußt. Im zweiten Versuch sinkt der R.-Q. von 0,79 auf 0,75 nach Alkohol, die O_2-Verbrauchswerte sinken maximal um 2%, sie steigen 3 Stunden nach Alkohol maximal um etwa 6%. Auch diese Änderungen kann man noch als innerhalb der physiologischen Schwankungen liegend betrachten.

Nicht so vollkommen entspricht der Voraussetzung des gleichbleibenden R.-Q. der Versuch an *Loewy* am 27. Mai 1926. Hier ist rechnerisch anders zu verfahren.

Der Nüchtern-O_2-Verbrauch beträgt 191,8 ccm bei einem R.-Q. von 0,911, das sind 0,947 Cal Erhaltungsumsatz pro Minute. Der R.-Q. sinkt nach Alkohol bis auf 0,759 bei einem O_2-Verbrauch von

---

[1] Gekürzt abgedruckt bei *Loewy* in Oppenheimers Handb. **6**, 274, 1926.

[2] *Tögel*, *Brezina* und *Durig*, diese Zeitschr. **50**, 329, 1913.

[3] Betreffs der Einzelwerte in diesen wie in allen folgenden Versuchen ist die am Schlusse befindliche Haupttabelle einzusehen.



194,3 ccm. Der verbrauchte O_2 verbrennt also eine Mischung von Alkohol und anderen Nährstoffen. Bezeichnet man bei Verbrauch von 1 Liter O_2 den auf Alkohol entfallenden Teil mit x Liter, so ist der auf andere Nährstoffe entfallende $= (1 - x)$ Liter O_2. Würde der R.-Q. auf den R.-Q. der reinen Alkoholverbrennung, d. h. auf 0,667 sinken, so wäre offenbar $x = 1$. Würde der R.-Q. bei 0,911 bleiben, so wäre $x = 0$. Der Differenz zwischen 0,911 und 0,667 = 0,244 entspricht ein Steigen des x von 0 auf 1. Das in unserem Falle tatsächlich stattfindende Sinken von 0,911 auf 0,759 = 0,152 würde also ein Steigen des x von 0 auf $\frac{0{,}152}{0{,}244} = 0{,}62$ entsprechen. D. h.: 62% des verbrauchten O_2 werden zur Verbrennung von Alkohol benötigt. Da der O_2-Verbrauch in diesem Versuch 194,3 ccm beträgt, so sind

62% von 194,3 ccm = 120,6 ccm O_2 = 0,5853 Cal (da 1 Liter O_2 bei Alk.-Verbrennung 4,848 Cal entspricht)
38% „ 194,3 „ = 73,7 „ O_2 = 0,3638 „ (bei R.-Q. 0,911)
Summa: 0,9491 Cal

Da der Nüchternwert (s. oben) 0,947 Cal beträgt, so ergibt dieser Versuch eine völlige Übereinstimmung der Kalorienproduktion vor und nach Alkohol.

Stillschweigende Voraussetzung bei der Berechnung war, daß das Verhältnis in der Verbrennung von Fett zu K.-H. unverändert blieb, daß also die neben dem Alkohol verbrennenden organischen Nährstoffe mit dem ursprünglichen R.-Q. (0,911) verbrannten. Nehmen wir aber an, daß dies nicht der Fall ist — auf welche Möglichkeit wir in einer späteren Arbeit zurückkommen werden —, so würde der größtmögliche Fehler der Berechnung dann eintreten, wenn neben Alkohol nur Fett verbrennen würde. In diesem Falle würde der Kalorienwert von 1 Liter O_2 von 4,93 auf 4,68 sinken, d. h. um 5%. Da aber der Alkohol sich mit etwa zwei Drittel am Umsatz beteiligt, würde nur ein Drittel von 5%, d. h. weniger als 2% in Betracht kommen. Diese 2% würden aber vollkommen innerhalb der Fehlergrenze liegen.

Die Versuche an *Bornstein* vom 13. April 1926 und 22. April 1926 zeigen ein geringeres Sinken der R.-Q. als der Versuch an *Loewy*. Leider finden sich bei *Bornstein* stärkere Schwankungen des Nüchtern-O_2-Verbrauchs zwischen 234 und 265 ccm O_2, die immerhin mit ± 6% noch innerhalb der konventionellen Schwankungsbreite liegen. Doch wird dadurch naturgemäß der Wert dieser Versuche etwas herabgesetzt; man kann jedoch zunächst sagen, daß die Werte nach Alkoholzufuhr innerhalb der gleichen Schwankungsbreite liegen wie die Nüchternwerte. Übersichtlicher werden die Verhältnisse, wenn man die Mittel-

werte der beiden, unter ganz gleichen Bedingungen durchgeführten Versuche nimmt. Es berechnet sich dann der O_2-Verbrauch zu:

vor	Alkoholaufnahme	= 250 ccm	pro Minute
25′ nach	„	= 255 „	„ „
54 „	„	= 260 „	„ „
116 „	„	= 255 „	„ „
169 „	„	= 266 „	„ „
245 „	„	= 241 „	„ „
	Mittel:	255 ccm	pro Minute

Der O_2-Verbrauch steigt also zunächst (innerhalb der physiologischen Breite) an, um zum Schluß auf einen Wert zu sinken, der zwar unterhalb des Ausgangswertes, aber auch noch innerhalb der physiologischen Breite liegt.

Als Gesamtresultat ergibt sich aus unseren Versuchen, daß durch Zufuhr von 30 g Alkohol beim nüchternen Menschen, d. s. 0,36 bis 0,5 g Alkohol abs. pro Kilogramm Körpergewicht keine Änderungen des O_2-Verbrauchs und des aus dem O_2-Verbrauch berechneten Kalorienbedarfs eingetreten sind.

Die oben (S. 277) durchgeführte Berechnung der Beteiligung des Alkohols an den Verbrennungen beruht auf der Senkung des R.-Q. nach Alkohol. Je höher der R.-Q. am Anfang ist, um so stärker wird die Senkung nachweisbar sein, während sie bei niedrigem R.-Q., also bei reiner oder fast reiner Fettverbrennung überhaupt kaum in Erscheinung tritt, wie der Versuch an *Bornstein* vom 13. Juni 1927 zeigt. Daher haben wir, um von hohen R.-Q. auszugehen, nach Ausführung der beiden Nüchternversuche Rohrzucker zugeführt, in der Art, wie es S. 272 geschildert ist. In ähnlicher Weise hatte schon *Durig* seine Versuche angeordnet, jedoch ging er so vor, daß er entweder auf einmal 100 g Dextrose oder dreimal je 30 g Lävulose im Verlauf von 2 Stunden an Kohlehydrat zuführte. Da wir unsere Versuche bis zum sicheren Verschwinden des Alkohols aus dem Blute fortsetzen wollten, dehnten wir auch die Kohlehydratzufuhr auf 7 Stunden aus, indem wir stündlich 25 g Rohrzucker, im ganzen also 175 g gaben. Es ergab sich aber die Notwendigkeit, als Kontrolle reine Zuckerversuche ohne Alkohol anzustellen. Über diese soll zunächst berichtet werden.

3. *Zuckerversuche ohne Alkohol.*

Nach Feststellung des Nüchternwertes wurden stündlich 25 g Rohrzucker 7 Stunden lang gegeben und jede Stunde der Gaswechsel gemessen. Es handelt sich um je 2 Versuche an Frl. *Heyer* und *Bornstein*.

Der R.-Q. war schon nach 1 Stunde in allen Versuchen gestiegen (s. Abb. 2). Nach 2 Stunden trat eine Senkung ein, der ein weiteres Ansteigen des Quotienten über den ersten Anstieg hinaus folgte. Dabei war ein individueller Unterschied zu konstatieren, indem bei Frl. *Heyer* der Anstieg zu weit höheren Werten — bis über 1 hinaus — erfolgte, bei *Bornstein* jedoch nur in einem Falle über 0,9 hinausging. Dieser Unterschied dürfte mit dem verschiedenen Energieaufwand zusammenhängen, der sich aus den Gaswechselversuchen errechnet.

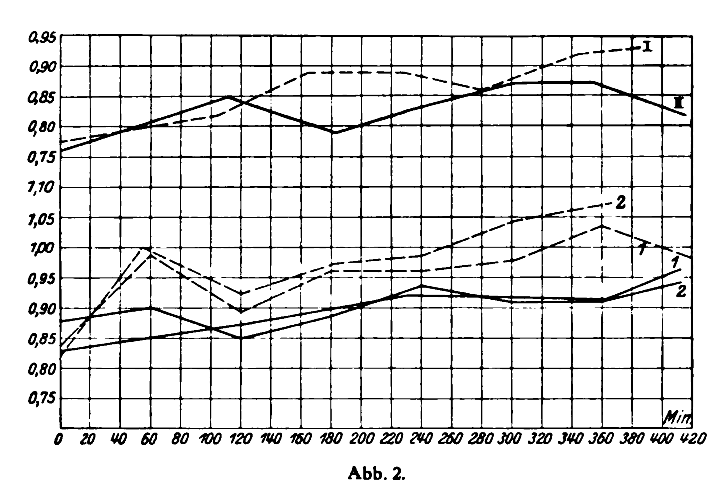


Abb. 2.
Respiratorische Quotienten der reinen Rohrzuckerversuche, stündlich 25 g Rohrzucker. Die unteren vier Versuche in Hamburg (1, 2), die oberen zwei in Muottas Muraigl (I, II).
—— *Bornstein*. - - - *Heyer*.

Aus ihnen berechnet sich an den Versuchstagen für Frl. *Heyer* ein Erhaltungsumsatz von 0,87 Cal. in der Minute = 52,2 Cal. in der Stunde. Diese würden gedeckt werden durch 13,5 g Zucker in der Stunde. Bei *Bornstein* dagegen ist der Kalorienbedarf in der Stunde = 80,4 Cal, entsprechend einen Bedarf von 20,1 g Zucker. Da die stündlich verabreichte Zuckermenge 25 g betrug, würde der Bedarf überschritten bei Frl. *Heyer* um 85%, bei *Bornstein* um nur 24%. Dementsprechend wird bei Frl. *Heyer* mehr Fett durch K.-H. im Stoffwechsel verdrängt und zum Teil sogar Fett aus K.-H. gebildet.

Die vorher besprochene *initiale Senkung des R.-Q. nach Zuckerzufuhr* steht nicht vereinzelt da. Sie ist bereits bei Traubenzuckerzufuhr mehrfach gesehen und hervorgehoben worden von *Bornstein* und *Holm*[1]. Sie ist auch in Versuchen von *Tögel*, *Brezina* und *Durig*[2]

---

[1] *Bornstein* und *Holm*, diese Zeitschr. **130**, 213, 1922.
[2] *Tögel*, *Brezina* und *Dürig*, ebendaselbst **50**, 296, 1913.

erkennbar. Sie ist nach Zufuhr von Rohrzucker kenntlich in einem Versuch von *Schirlitz*[1]. Ihre Bedeutung ist unsicher, und wir möchten theoretische Betrachtungen darüber vermeiden.

Was die *Umsatzsteigerung nach Zuckerzufuhr* anbetrifft, so zeigt schon ein Blick auf die Anhangstabellen, daß sie nur sehr gering gewesen ist. Man kann, um ein Bild von der kalorischen Wirkung während der ganzen Untersuchungszeit zu gewinnen, in ähnlicher Weise wie *Schirlitz* (l. c., S. 25) vorgehen; man interpoliert durch Mittelung je zweier, aufeinander folgender Gaswechselwerte, die in kalorische Werte umgerechnet sind, den Umsatz in den Pausen zwischen den Respirationsversuchen, addiert die gefundenen Werte und erhält so die während des Gesamtversuches verbrauchten Kalorien. Von diesen subtrahiert man die auf dieselbe Zeit berechnete Kalorienmenge, die sich aus den Nüchternversuchen ergeben würde. Der Überschuß stellt die spezifisch-dynamische Wirkung der zugeführten K.-H. dar. Z. B.

Versuche vom 4. Oktober 1926 an Frl. *Heyer*.

Tabelle II.

	O_2-Verbrauch pro Minute ccm	CO_2-Ausscheidung pro Minute ccm	O_2-Verbrauch Liter	CO_2-Ausscheidung Liter	Kalorien
Vor Zuckerzufuhr	181,3	150,2			
Min. nach Zuckerzufuhr					
0 bis 61	182,9	166,2	11,157	10,138	
61 „ 121	180,3	165,2	10,818	9,912	
121 „ 183	180,3	170,4	11,179	10,565	
183 „ 241	179,1	173,0	10,388	10,034	
241 „ 304	179,5	180,5	11,308	11,371	
304 „ 367	176,9	181,7	11,145	11,447	
0 bis 367	R. Q. =	0,962	65,995	63,467	330,0
			Nüchternwert:		321,8
			Spez.-dynam. Wirkung:		8,2

Auf Grund dieser Rechnung ergibt sich bei Frl. *Heyer* ein Plus an Kalorien für die Dauer von 6 bzw. 7 Stunden von 8,2 Cal. (4. Oktober 1926) und 14,5 Cal. (30. September 1926), im Mittel von 11,3 Cal. Das wären 1,6% der mit dem Rohrzucker zugeführten Kalorienmenge. Bei *Bornstein* sind nach Zucker weniger Kalorien verbraucht, als im nüchternen Zustande, nämlich — 9,4 Cal (28. September 1926) und — 9,5 Cal (18. September 1926), entsprechend — 1,3% der zugeführten

[1] *Schirlitz*, diese Zeitschr. 188, 36, 1927, Versuch vom 8. Februar 1926.



Kalorien. Die Werte an beiden Personen liegen vollkommen innerhalb der Fehlerbreite, so daß man sagen kann, daß eine spezifisch-dynamische Wirkung nicht zu beobachten gewesen ist.

Dieser Mangel einer spezifisch-dynamischen Wirkung nach Verabfolgung von 175 g Rohrzucker in refracta dosi ist einigermaßen auffallend, da nach 100 g Rohrzucker in *einer* Dosis eine deutliche spezifisch-dynamische Wirkung von im Mittel 6,2 % in Versuchen von *Schirlitz* (l. c., S. 26) sich zeigte. Im übrigen ist bekannt, daß auch 100 g Traubenzucker bzw. Lävulose Steigerungen von ähnlicher Größenordnung hervorrufen. (*Benedict, Durig*). Bekannt ist auch, daß die spezifisch-dynamische Wirkung nach K.-H. nicht proportional den zugeführten Zuckermengen, sondern stärker ansteigt. Darin dürfte möglicherweise der Grund für die geringe Wirkung verzettelter Dosen zu suchen sein.

4. Alkohol-Zuckerversuche. Verhalten des R.-Q.

Wie schon oben erwähnt, sind diese Versuche so durchgeführt, daß Zucker in gleicher Weise gegeben wurde wie in der eben beschriebenen Reihe, nur daß mit der dritten Zuckergabe von 25 g gleichzeitig Alkohol gegeben wurde. Die Alkoholmenge betrug bei *Loewy* und *Bornstein* 30 g, bei Frl. *Heyer* fast immer 25 g.

Wir haben nun die wesentlichen Veränderungen des Gaswechsels an sich und im Vergleich zum Alkoholgehalt des Blutes bis zum Verschwinden des Alkohols aus diesem verfolgt.

Der R.-Q. zeigte in den ersten 2 bis 3 Stunden eine starke Senkung, die bereits aus den *Durig*schen Versuchen bekannt ist. Während dieser Zeit kreist noch Alkohol in größeren oder geringeren Mengen im Blute. Unsere Versuchsanordnung und die Ausdehnung unserer Versuche gestattete uns aber, auch in den folgenden Stunden den Verlauf der Kurve zu verfolgen.

Es zeigte sich (vgl. Tabelle II und Abb. 1 B), daß der R.-Q. bei allen Personen schon nach ½ Stunde stark gesunken war, um während der ersten 3 Stunden im allgemeinen ziemlich gleichmäßig niedrig zu bleiben. Das Minimum wurde im Mittel der Versuche bei Frl. *Heyer* nach 1 Stunde bereits erreicht, bei *Bornstein* und *Loewy* erst nach 3 Stunden, doch sind die Unterschiede bis zum beginnenden Wiederanstieg im allgemeinen gering. In der vierten Stunde beginnt in sämtlichen Versuchen der R.-Q. mehr oder weniger steil wieder anzusteigen; in der fünften Stunde ist der Anstieg immer sehr beträchtlich, so daß das Ausgangsniveau fast wieder erreicht wird. Der Verlauf der Kurven in den einzelnen Versuchen läßt sich aus den Werten der Anhangs-



Tabelle II.

Zeit nach Alkoholgabe Std.	Respirator. Quotient	Blutalkohol %
	Loewy.	
0	0,925	0,000
½	0,83	0,074
1	0,80	0,065
3	0,77	0,004
4	0,83	0,003
5	0,92	0,002
	Bornstein.	
0	0,96	0,000
½	0,85	0,045
1	0,82	0,043
3	0,77	0,004
4	0,83	0,003
5	0,91	0,002
	Heyer.	
0	0,95	0,000
½	0,84	0,045
1	0,82	0,046
3	0,825	0,018
4	0,85	0,005
5	0,90	0,003

tabellen entnehmen. In einer folgenden Arbeit werden die Einzelkurven zugleich mit anderen wiedergegeben werden.

Ein Vergleich der Alkohol-Zucker-Kurven mit den reinen Zuckerkurven bestätigt also das *Durig*sche Ergebnis des plötzlichen Abfalles des R.-Q. Dies wurde von *Durig* auf ein Zurückdrängen der K.-H. aus dem Stoffwechsel durch Alkohol zurückgeführt. Wir bringen mit unseren Versuchen einen weiteren Beweis für diese Anschauung.

Vergleicht man das Verhalten der R.-Q. mit dem Alkoholgehalt des Blutes, wie es für die Mittelwerte jeder Person sich am besten in Tabelle II darstellt, so tritt auf den ersten Blick hervor, wie das Sinken des Quotienten mit dem plötzlichen Anstieg des Blutalkohols in allen Fällen zusammenfällt. Im weiteren Verlauf bleibt jedoch der R.-Q. während der ersten 3 Stunden ziemlich gleichmäßig niedrig, während der Blutalkohol mehr und mehr absinkt. Der niedrigste Wert des

R.-Q. wird bei zwei von den drei Versuchspersonen sogar erst erreicht zu einer Zeit, zu der der Blutalkohol nur noch wenig den Nullpunkt überschreitet. Sobald aber dieser Moment erreicht ist, d. h. wenn der Blutalkohol von etwa 0,06 % im Mittel auf 0,003 % im Mittel abgesunken ist, beginnt auch schon der R.-Q. wieder zu steigen. Beides geht deutlich aus Tabelle II hervor.

Bei der Erklärung dieses Befundes könnte man zunächst den Einwand erheben, daß die Verbrennung des Alkohols nicht von seiner Konzentration im Blute, vielmehr von der in den Geweben abhängt, und daß die Gewebe nicht notwendigerweise den Alkohol aus dem Blute entsprechend seiner Konzentration im Blute aufnehmen. Gegen diesen Einwand sprechen, neben allgemeinen Erfahrungen über die Diffusionsgeschwindigkeit, im speziellen Ergebnisse älterer Forscher, wie *Gréhant*[1]. Er bestimmte zu gleicher Zeit den Alkoholgehalt des Blutes und der Gewebe zu verschiedenen Zeiten nach Alkoholzufuhr. Berechnet man aus seinen Werten das Verhältnis von Alkoholkonzentration in den Geweben zu Alkoholkonzentration im Blute bei den von ihm gefundenen Konzentrationen in letzterem, so zeigt sich, daß dies Verhältnis unter allen Bedingungen der Alkoholkonzentration im Blute und der Zeit recht konstant ist und nur mit einer Differenz von ± 10% unregelmäßig um ein Mittel schwankt. Das zeigt folgende Tabelle III.

Tabelle III.

Gréhants Kaninchenversuche.

Zeit nach Alkoholzufuhr Std.	Alkohol im Blute %	Alkohol in den Geweben %	Gewebsalkohol / Blutalkohol
1	0,337	0,250	0,742
3	0,400	0,263	0,656
6	0,257	0,184	0,727
12	0,125	0,086	0,811

Der Sättigungsgrad der Gewebe mit Alkohol entspricht rund drei Viertel vom Sättigungsgrad des Blutes. Den geringen Schwankungen des Verhältnisses von ± 10 % stehen in unseren Versuchen Schwankungen des Alkohols um mehr als 1000 % gegenüber, im Bereich derer der R.-Q., d. h. die Verbrennung des Alkohols praktisch konstant ist.

Zur Erklärung könnte man verschiedene Zusammenhänge vermuten. Zunächst wäre es möglich, daß die höheren Alkoholkonzen-

[1] S. *Rosemann*, S. 488.



trationen, die im Beginn im Blute sich befinden, bereits genügen, um einen schädigenden Einfluß auf die Oxydation des Alkohols in den Geweben auszuüben. Dagegen könnte man einwenden, daß es schwierig ist einzusehen, warum die höheren Alkoholkonzentrationen gerade die Oxydation des Alkohols, nicht aber die der übrigen Nährstoffe hemmen sollten. Näher liegt es vielleicht anzunehmen, daß während der Verbrennung des Alkohols die Fähigkeit des Organismus dazu langsam zunimmt. Derartige Vorgänge sind im biologischen Geschehen vielfältig bekannt. Sehr bekannt ist das Phänomen der „Treppe" am Muskel und Nerven; es bedeutet, daß im Verlaufe weniger Sekunden die Leistungsfähigkeit durch die Leistung selbst gewaltig gesteigert werden kann. Für den speziellen Fall des Alkohols sind uns zwei Tatsachen bekannt, die in dieselbe Richtung weisen. Für die Tatsache, daß eine Gewöhnung gewisser Funktionen an Alkohol verhältnismäßig schnell eintreten kann, sprechen Angaben, nach denen man sogar am überlebenden Herzen im Verlauf einer Durchblutung eine Anpassung an den Alkohol beobachten kann derart, daß anfangs die Herztätigkeit stark schädigende Konzentrationen dann gut vertragen werden, wenn man das Herz erst mit geringeren Alkoholkonzentrationen speist und diese dann steigert *(Dixon)*. Ein bekanntes Beispiel der schnellen Gewöhnung des Stoffwechsels an den Alkohol stellt die Tatsache dar, daß bei nicht an Alkohol gewöhnten Individuen der Alkohol zunächst den N-Umsatz steigert, jedoch schon nach kurzer Zeit eiweißsparend wirkt.

Angesichts des Verhaltens des R.-Q. nach Alkoholzufuhr wirft sich die Frage auf, *wieviel Alkohol* während der Versuchszeit *zur Verbrennung gelangt* ist, und ob anzunehmen ist, daß der verabfolgte Alkohol während der Beobachtungsdauer von 5 Stunden vollständig verbrannt ist. Diese letztere Annahme könnte nahe gelegt werden durch das Absinken des Blutalkohols auf die normalen Ausgangswerte. Jedoch zeigen unsere Kurven, daß der R.-Q. fast niemals auf die Höhe des nach Zuckerzufuhr allein gefundenen Ausgangswertes zurückkehrt. Das weist darauf hin, daß noch der Verbrennung unterliegende Alkoholreste im Körper vorhanden sind. Selbst die Rückkehr des R.-Q. zum Ausgangswerte würde aber noch nicht eine vollkommene Verbrennung des Alkohols erweisen, denn wie aus Kurventafel 2 ersichtlich, stellte sich der R.-Q. in der letzten Stunde der reinen Zuckerversuche auf ein höheres Niveau ein als am Anfang. Wollen wir daher nicht annehmen, daß der Alkohol im Körper zu grundlegenden Veränderungen in der Verbrennung der übrigen Nährstoffe geführt hat, so bleibt uns nur der Schluß übrig, daß die Verbrennung von Alkohol noch weiter geht, trotzdem kein Alkohol im Blute mehr nachgewiesen werden kann.

In Übereinstimmung hiermit würden die zahlreichen Untersuchungen von *Völtz*[1] und Mitarbeitern stehen, die ebenso wie *Gréhant* 10 Stunden und mehr nach Alkoholzufuhr noch Alkohol in den Geweben fanden. Allerdings ist dabei zu beachten, daß die den Tieren zugeführten Alkoholdosen um das Mehrfache die den Menschen gegebenen übertreffen, und daß, wenigstens in den Versuchen von *Gréhant*, auch noch beträchtliche Alkoholmengen im Blute vorhanden waren. Gegen unsere Anschauung spricht scheinbar das in Tabelle III wiedergegebene Verhalten, wonach die Alkoholkonzentrationen in Blut und Geweben parallel gehen, so daß beim Verschwinden des Alkohols aus dem Blute auch die Gewebe alkoholfrei sein müßten. Es ist jedoch zu bemerken, daß *Gréhant* gerade dasjenige Gewebe nicht auf seinen Alkoholgehalt untersucht hat, das sich am meisten mit Alkohol anreichert und diesen am längsten zurückzuhalten vermag, nämlich das Fettgewebe. So findet *Vollmering*[2], daß der Alkoholgehalt des Fettgewebes noch viele Stunden nach Alkoholzufuhr ansteigt, so daß er den Alkoholgehalt des Blutes und sämtlicher Organe schließlich übertrifft. Es wäre also sehr wohl möglich, daß von diesem Alkoholdepot aus allmählich der Alkohol zur Verbrennung gelangt. Die Abgabe des Alkohols aus den Depots müßte allerdings so langsam geschehen, daß eine deutliche Anreicherung des Blutes an Alkohol nicht stattfände.

Berechnet man in der S. 277 angegebenen Weise O_2-Verbrauch und CO_2-Bildung während der gesamten Versuchsdauer und bringt davon unter der Annahme *vollständiger* Alkoholverbrennung in Abzug die auf den verbrannten Alkohol entfallenden Mengen beider Werte (nach Anbringung der nötigen kleinen Korrekturen für die mit Atmung und Harn wieder ausgeschiedene Alkoholmenge), so errechnen sich für die Verbrennung der übrigen organischen Substanzen respiratorische Quotienten, die unmöglich sind, z. B. ein solcher von 1,25 oder gar von 2,9. Das beweist, daß die Annahme, es sei während der 5 Beobachtungsstunden sämtlicher Alkohol verbrannt, unmöglich zutreffen kann.

5. *Alkohol-Zuckerversuche. Spezifisch-dynamische Wirkung.*

Aus O_2 und R.-Q. haben wir den Energieumsatz während der einzelnen Versuchsreihen in der gleichen Art berechnet, wie beim Erhaltungsumsatz und bei den reinen Zuckerversuchen. Die Ergebnisse zeigt die folgende Tabelle IV.

---

[1] *Völtz*, Schriften d. Königsberg. Gelehrt. Ges., Naturw. Kl., 2. Jahrg. 1926, S. 123.

[2] *Vollmering, J. D.*, Gießen 1912.



Tabelle IV.

Datum	Person	Versuchsdauer Min.	O_2-Überschuß über Nüchternwert während d. Versuchszeit Liter	R.-Q.	Spezifisch-dynam. Wirkung	
					Kalorien während der Versuchsdauer	in % der zugeführten Kalorien
27. VII.	*L.*	440	7,11	0,85	34,6	3
29. VII.	*L.*	428	11,81	0,87	57,8	6
1. VII.	Frl. *H.*	447	4,23	0,82	20,4	2
8. VII.	Frl. *H.*	455	5,76	0,83	27,8	3
15. VII.	Frl. *H.*	466	3,35	0,84	16,3	2
22. VII.	Frl. *H.*	452	9,00	0,88	44,0	5
26. VII.	*Bo.*	422	0,80	0,89	4,0	1/2

Es zeigt sich in allen Versuchen mit einer Ausnahme eine spezifisch-dynamische Wirkung, die, wenn sie auch gering ist, doch die Fehlergrenzen deutlich übersteigt. Im Gegensatz dazu war, wie wir oben gezeigt hatten, weder durch den Alkohol allein noch durch den Rohrzucker in der Art, wie wir ihn verabfolgten, eine spezifisch-dynamische Wirkung nachweisbar gewesen.

Die Erklärung dieses Verhaltens kann mit Sicherheit nicht gegeben werden. Es ist zur Zeit noch so wenig durchsichtig, wie manche anderen analogen Erfahrungen auf dem Gebiete der spezifisch-dynamischen Wirkung der Nahrungsstoffe. Wenn man von der recht plausiblen und durch einige ältere Versuche gestützten Annahme ausgeht, daß sowohl der Alkohol als auch der Rohrzucker eine gewisse, umsatzsteigernde Wirkung haben, die jedoch durch unsere Methoden nicht sicher nachweisbar ist, so könnte der Fall einer „Potenzierung" vorliegen. Solche Potenzierungen sind bekannt z. B. für Gemische von Aminosäuren, so von Glykokoll und Alanin[1].

6. *Atemmechanik.*

Eine nur kurze Erwähnung sei der Atemmechanik unter der Alkoholwirkung gewidmet. Da durch die Verabfolgung von Zucker allein schon die Atemmechanik geändert werden kann, eignen sich nur die reinen Alkoholversuche zur Diskussion. Es handelt sich um sechs Versuche. Wie aus den Anhangstabellen hervorgeht, ist die Wirkung eine sehr geringe. Nur einmal findet sich bei *Bo.* (13. April 1926) eine Erhöhung von 5,0 auf 5,7 Liter, die über die physiologische Schwankungsbreite von 10% etwas herausgeht. Die Ventilationssteigerung trat erst 1 Stunde nach Alkoholgabe ein und hielt $1^3/_4$ Stunden an. In allen anderen Versuchen finden sich kleinere, innerhalb eines halben Liters liegende Zu- oder Abnahmen. Die Frequenz der Atemzüge blieb praktisch unverändert. Diese Befunde

[1] *Weiss* und *Rapport*, Journ. of biol. Chem. **60**, **513**, **1924**.

stehen mit den in der Literatur niedergelegten Angaben in vollkommener Übereinstimmung[1].

Immerhin reichen die geringen vorhandenen Änderungen aus, um Änderungen der alveolaren CO_2-Spannung zu erzeugen. Berechnungen hierüber liegen bis jetzt in der Literatur nicht vor. Diese Berechnungen erschienen uns wichtig, da sie einen Rückschluß erlauben auf den Erregbarkeitszustand des Atemzentrums. Auf diese läßt ja die Ventilationsgröße als solche keinen sicheren Schluß zu, besonders wenn die Produktion der CO_2, als des physiologischen Atemreizes, sich ändert. Das tritt aber gerade unter Wirkung des Alkohols ein, der seines niedrigen R.-Q. wegen verhältnismäßig wenig CO_2 bei seiner Verbrennung entstehen läßt.

Die Ergebnisse unserer für diese Frage in Betracht kommenden Versuche enthält folgende kleine Tabelle V.

Tabelle V.

		Alveolare CO_2-Spannung %
Loe.	27. V. 1926	5,09
	3 Stunden nach Alkoholgabe	5,22
Bo.	13. IV. 1926	7,06
	3 Stunden nach Alkoholgabe . . .	5,71
	22. IV. 1926	6.26
	1 Stunde nach Alkoholgabe	5.17
	4 Stunden „ „	6,32
	13. IV. 1927	6,15
	2 Stunden nach Alkoholgabe . . .	5,87
Schirl.	6. III. 1926	7,34
	1/2 Stunde nach Alkoholgabe . . .	6,49
	9. III. 1926	6,92
	1/2 Stunde nach Alkoholgabe . . .	7,95
	1 „ „ „ . . .	7,58

Sie zeigt dreimal an einer Versuchsperson (*Bo.*) 1 bis 3 Stunden nach der Alkoholgabe eine Herabsetzung der alveolaren CO_2-Spannung, während nach 4 Stunden die Wirkung verschwunden ist. Bei einer zweiten Person (*Loe.*) läßt sich in einem Versuche keine Wirkung beobachten. Bei einer dritten Person (*Schirl.*) ist die Wirkung in zwei Versuchen einander entgegengesetzt. In einem Falle findet sich nach ½ Stunde eine Herabsetzung, im zweiten Versuch unter den gleichen Bedingungen nach ½ und 1 Stunde eine Erhöhung der alveolaren CO_2-Spannung. Es konkurriert wohl eine zweifellos bestehende allgemein-narkotische Wirkung mit einem Erregungsreiz des Atemzentrums, wobei einmal die eine, das andere Mal die andere Wirkung überwiegt. Immerhin ist bemerkenswert, wie trotz der narkotischen

[1] Vgl. besonders die Zusammenfassung bei *Wendelstadt* in Pflügers Arch. **76**, 223, 1899.



Wirkung, die sich meist im Eintritt eines festen Schlafes während der Versuche äußerte, die erregende Wirkung auf das Atemzentrum zum Durchbruch kommen kann.

7. *Wirkung des Alkohols auf die Nierensekretion.*

Eine diuretische Wirkung des Alkohols ist oft beschrieben worden. Sie ist so groß, daß sie allein durch die Wassermenge, die mit dem Alkohol gleichzeitig zugeführt wird, nicht zu erklären ist[1]. Auch in unseren Versuchen war in der Mehrzahl der Fälle nach der Alkoholzugabe eine Vermehrung der Urinmenge zu finden, die häufig wesentlich größer war als die geringen Wassermengen (50 bis 80 ccm), die gleichzeitig mit dem Alkohol verabfolgt wurden, z. B.:

Versuch vom 13. Juni 1927 an *Bornstein*. Keine Nahrung seit 12 Stunden.

Zeit	Urinmenge		Bemerkungen
	während der Zeit ccm	pro Stunde ccm	
5h16' bis 8h43'	115	33	
8 43 „ 11 25	280	97	9h15' 30 g Alkohol
11 25 „ 2 30	140	45	
2 30 „ 4 00	58	39	

Die Harnflut ging immer mit einer sehr großen, prozentualen Verdünnung des Urins an N und NaCl vor sich, während die ausgeschiedenen absoluten Mengen der Substanzen gleich blieben oder sogar kleiner wurden, wie folgendes Beispiel zeigt:

Versuch vom 19. August 1926 an *Bornstein* auf Muottas Muraigl (2450 m).

Zeit	Urinmenge		Stickstoff		NaCl		Bemerkungen
	während der Zeit ccm	pro Std. ccm	%	g pro Std.	%	g pro Std.	
5h55' bis 8h18'	311	130	0.572	0,744	1,447	1,895	
8 18 „ 10 35	221	97	0,631	0,612	1,333	1,290	10h40' 30 g Alkohol
10 35 „ 12 44	448	208	0,272	0,566	0,538	1,120	
12 44 „ 4 12	160	46	0,879	0,404	0,967	0,445	

Es handelt sich also lediglich um eine Vermehrung der Wasserdiurese, während in der Ausscheidung der festen Substanzen keine Vermehrung eintritt. Das ist um so auffallender, als nach den bekannten Versuchen von *R. O. Neumann* eine Ausschwemmung von N durch die vermehrte Diurese erwartet werden könnte.

Gemeinsam mit Herrn *Gremels* wollten wir die Wirkung des Alkohols auf die Tätigkeit der überlebenden Niere beobachten. Wir durchbluteten

[1] Literatur bei *Kochmann* in Heffters Handb. d. Pharmacol. 1, 327 bis 329.



zu diesem Zwecke eine isolierte Hundeniere, die mittels des *Starling*schen Herz-Lungenpräparats durchströmt war. Nach dem Zusatz des Alkohols, der im Hundeblut zuvor verdünnt war, hörte plötzlich die Sekretion der Niere ganz auf. Die Alkoholkonzentration im Blute betrug 0,058%, war also so groß, wie in unseren Menschenversuchen. Man wird nach diesem Versuch mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit annehmen müssen, daß der Angriffspunkt der Alkoholdiurese extrarenal gelegen ist. Auffallend ist die starke Giftempfindlichkeit der überlebenden Niere, die übrigens anderen diuretisch wirkenden Substanzen gegenüber (Theobromin, Digitalis usw.) nicht vorhanden ist[1].

Zusammenfassung.

Versuche an 4 Personen ausgeführt nach Zufuhr von 25 bis 30 g Alkohol per os unter Bestimmung des Alkoholgehaltes des Blutes und des Gaswechsels während 5 Stunden ergaben folgendes:

1. Der Alkoholgehalt steigt innerhalb ½ Stunde auf etwa 0,05 bis 0,075%, um sodann allmählich zu sinken, so daß das Blut nach etwa 4 Stunden wieder alkoholfrei wird.

2. Der Erhaltungsumsatz wurde durch die verabfolgten Alkoholmengen nicht verändert, d. h. eine sogenannte spezifisch-dynamische Wirkung war nicht festzustellen.

3. Zur Kenntlichmachung der Alkoholwirkung auf den Gaswechsel führten wir größere Mengen von Kohlehydraten in stündlichen Gaben 7 Stunden lang zu und erhöhten dadurch vor der Alkoholdarreichung den R.-Q. Nach der Alkoholzufuhr begann der R.-Q. sofort auf ein Niveau zu sinken, das er etwa 3 Stunden lang inne hielt, um dann langsam wieder anzusteigen.

4. Trotzdem in diesen 3 Stunden der Alkoholgehalt des Blutes von 0,06% im Mittel auf 0,004% sank, blieb doch der R.-Q. fast unverändert; oft lag er sogar bei nur noch kleinen Alkoholmengen im Blute niedriger als bei höheren. Das bedeutet, daß die Alkoholverbrennung in den Geweben in hohem Maße unabhängig ist vom Alkoholangebot seitens des Blutes.

5. Trotzdem weder nach Alkoholzufuhr allein, noch allein nach Zuckerzufuhr in der von uns verwendeten Form eine „spezifisch-dynamische Wirkung" auftrat, war eine solche unter Alkohol + Zuckerzufuhr deutlich, wenn auch nicht sehr stark ausgeprägt. Worauf diese „Potenzierung" beruht, ist unsicher.

Ein zweite Mitteilung wird sich mit den Veränderungen der Alkoholwirkung im Hochgebirge befassen.

[1] S. Gremels Arch. f. exper. Pathol. 1927.



Generaltabelle.

Datum	Zeit	Atemvolumen Min./Liter abgelesen	Atemfrequenz	R.-Q.	Pro Minute ccm O_2 verbraucht	Alkoholgehalt im Blut mg-%	Versuchsbedingungen: Zuckerzufuhr: Minuten nach erster Zufuhr	Versuchsbedingungen: Zuckerzufuhr: Gesamt-Zuckermengen g	Versuchsbedingungen: Alkoholzufuhr: Minuten nach 30 g
					Schirlitz.				
6. III.	9h 39'	5,16	13	0,753	264,3				
	9 55	5,08	14	0,791	249,6				
	10 43	5,45	16	0,737	242,4				25
	11 05	5,45	15	0,750	248,5				47
	12 10	5,27	13	0,783	246,4				112
	1 05	5,37	14	0,758	254,4				167
9. III.	8 18	5,23	14	0,798	235,4				
	8 36	4,91	14	0,779	227,8				
	9 57	4,97	16	0,752	238,8				30
	10 26	4,89	14	0,778	240,5				59
	11 26	4,90	14	0,796	226,5				119
	12 39	4,80	14	0,760	246,9				192
					Bornstein.				
13. IV.	8h 33'	5,16	12	0,888	242,0				
	8 51	4,92	12	0,895	226,2				
	9 38	5,48	12	0,791	248,4				23
	9 59	5,48	10	0,814	257,9				44
	10 13	5,63	13	0,796	257,9				58
	11 14	5,65	12	0,800	249,7				119
	11 58	5,75	12	0,773	265,8				163
	1 25	5,26	13	0,780	239,9				250
22. IV.	8 38	5,99	12	0,884	262,6				
	8 55	5,89	12	0,871	268,1	0,012			
	9 59	6,00	12	0,813	262,6	0,055			27
	10 29	6,40	12	0,799	271,7	0,075			57
	11 25	5,76	13	0,785	262,4	0,062			113
	12 27	5,72	12	0,783	266,7	0,018			175
	1 32	5,28	12	0,812	242,3	0,025			240
	2 30	5,71	11	0,854	241,8	0,014			298
	3 30	5,44	10	0,797	255,2	0,016			358
19. VII.	8 16	6,526	11	0,912	276,4		vorher		
	8 26	6,700	11	0,930	280,2		„		
	9 23	7,215	12	0,982	269,5		50	25	
	10 27	6,505	14	0,000	258,0	0,001	140	50	
	11 08	6,737	12	0,853	262,2	0,057	115	75	27
	11 39	6,750	15	0,802	263,7	0,043	186	75	54
	12 35	6,711	15	0,765	288,5	0,019	242	100	110
	1 33	6,962	14	0,784	301,9	0,007	300	125	168
	2 31	7,686	14	0,901	285,6	0,003	358	150	226
	3 34	6,822	13	0,920	247,3	0,001	421	175	289
26. VII.	8 48	6,271	11	0,896	273,9		vorher		
	8 58	6,400	11	0,909	278,2		„		
	10 02	6,500	12	0,916	273,1		62	25	
	10 46	7,029	13	0,958	284,3	0,000	106	50	
	11 31	6,464	12	0,846	267,2	0,036	151	75	26
	12 03	6,350	11	0,840	274,7	0,044	183	75	58
	12 55	6,962	11	0,866	284,0	0,017	235	100	110

Datum	Zeit	Atemvolumen Min./Liter abgelesen	Atemfrequenz	R.-Q.	Pro Minute ccm O_2 verbraucht	Alkoholgehalt im Blut mg-%	Versuchsbedingungen: Zuckerzufuhr: Minuten nach erster Zufuhr	Zuckerzufuhr: Gesamt-Zuckermengen g	Alkoholzufuhr: Minuten nach 30 g
				Bornstein.					
26. VII.	2h01′	6,662	12	0,767	299,1	0,001	301	125	176
	2 55	6,300	11	0,844	266,5	0,000	355	150	230
	4 02	6,663	12	0,935	257,0	0,000	422	175	297
28. IX.	7 57	5,965	11	0,821	280,7		vorher		
	8 08	6,111	11	0,846	281,4		„		
	10 13	6,323	10	0,874	278,9		122	50	
	12 01	6,618	14	0,924	266,6		230	100	
	1 12	6,724	13	0,917	269,1		301	125	
	2 10	6,191	11	0,910	250,4		359	150	
	3 08	6,743	12	0,946	278,2		417	175	
				Loewy.					
27. V.	8h27′	5,640	12	0,899	193,3				
	8 36	5,550	12	0,923	190,3	0,004			
	9 40	5,453	12	0,791	196,5	0,037			24
	10 20	5,190	12,5	0,759	194,3	0,041			64
	11 18	5,290	12	0,822	188,2	0,013			122
	12 15	4,830	12	0,787	180,9	0,016			179
	1 18	4,910	11,4	0,780	190,7	0,006			242
	2 10	5,347	12	0,811	193,1	0,003			294
27. VII.	8 36	5,633	15	0,840	186,5		vorher		
	8 46	5,610	13	0,843	189,4		„		
	8 56	5,644	13	0,883	178,8		„		
	10 00	6,025	14	0,902	191,8		60	25	
	10 57	5,860	12	0,908	190,6	0,000	117	50	
	11 46	6,100	14	0,817	207,5	0,075	166	75	26
	12 14	6,487	13	0,819	210,2	0,053	194	75	54
	1 15	6,224	13	0,816	210,7	0,027	255	100	115
	2 20	6,271	14	0,780	214,0	0,0045	320	125	180
	3 13	6,425	15	0,826	212,8	0,004	373	150	233
	4 20	6,576	13	0,943	186,9	0,004	440	175	300
29. VII.	8 46	5,076	12	0,875	175,8		vorher		
	8 57	5,122	12	0,886	179,28		„		
	10 05	6,667	14	0,941	215,12		65	25	
	10 58	6,200	11	0,963	202,4	0,003	118	50	
	11 40	6,262	13	0,838	211,6	0,073	160	75	25
	12 09	5,611	13	0,777	207,1	0,066	189	75	54
	1 09	6,090	13	0,827	217,7	0,029	249	100	114
	2 16	5,800	14	0,773	208,0	0,005	316	125	181
	3 08	6,437	13	0,866	208,1	0,001	368	150	233
	4 08	6,150	14	0,898	197,9	0,000	428	175	293
				Frl. *Heyer.*					
1. VII.	8h34′	4,017	13	0,803	187,4		vorher		
	8 47	4,217	14	0,805	186,16		„		
	9 57	4,391	14	0,854	180,1		62	25	
	10 53	4,910	13	0,921	189,9		118	50	
	11 53	4,650	15	0,827	199,4		178	75	27
	12 31	5,050	15	0,829	208,1		216	75	65
	1 23	4,860	14	0,854	195,2		268	100	117

Datum	Zeit	Atemvolumen Min./Liter abgelesen	Atemfrequenz	R.-Q.	Pro Minute ccm O_2 verbraucht	Alkoholgehalt im Blut mg-%	Versuchsbedingungen: Zuckerzufuhr: Minuten nach erster Zufuhr	Zuckerzufuhr: Gesamt-Zuckermengen g	Alkoholzufuhr: Minuten nach 25 g
					Frl. *Heyer*.				
1. VII.	2h29'	4,691	16	0,818	208,6		334	125	183
	3 23	4,686	15	0,867	205,6		388	150	237
	4 22	4,638	13	0,872	204,2		447	175	296
8. VII.	8 28	3,850	13	0,765	188,6		vorher		
	8 41	3,677	12	0,816	177,0		„		
	9 48	4,510	13	0,903	179,3		63	25	
	10 44	4,648	11	0,977	185,7		119	50	
	11 50	5,060	15	0,861	210,3		185	75	27
	12 26	5,095	16	0,824	216,2		221	75	63
	1 20	4,473	15	0,828	190,0		275	100	117
	2 22	4,740	15	0,820	202,3		337	125	179
	3 43	4,710	15	0,838	202,6		418	150	250
	4 20	4,819	14	0,899	199,2		455	175	297
15. VII.	8 40	4,209	14	0,806	183,5		vorher		
	8 52	4,300	14	0,835	183,4		„		
	10 47	5,316	13	0,939	185,0	0,001	112	50	
	12 06	5,253	15,5	0,846	192,7	0,043	191	75	24
	12 44	5,611	17	0,822	199,6	0,054	229	75	62
	1 57	4,667	16	0,805	177,1	0,038	302	100	135
	2 55	5,478	15	0,843	205,7	0,024	360	125	193
	3 50	5,358	15	0,862	198,1	0,008	415	150	248
	4 41	5,432	15	0,923	204,0	0,002	466	175	299
22. VII.	8 35	4,245	13	0,895	169,5		vorher		
	8 47	4,127	13	0,884	166,3		„		
	9 42	5,030	13	1,051	179,1		52	25	
	10 51	4,880	11	0,956	200,2	0,001	121	50	
	11 42	4,740	14	0,857	199,7	0,061	172	75	28
	12 15	4,235	15	0,802	188,2	0,063	205	75	61
	1 14	4,042	15	0,789	172,3	0,047	264	100	120
	2 25	4,391	12	0,833	197,7	0,024	335	125	191
	3 23	4,680	13	0,839	205,3	0,008	393	150	249
	4 22	4,518	12	0,924	182,6	0,003	452	175	308
30. IX.	8 42	3,835	13	0,818	179,7		vorher		
	8 53	3,718	13	0,810	178,5		„		
	9 50	4,684	13	0,994	185,7		56	25	
	10 56	4,300	12	0,892	181,3		122	50	
	11 54	4,533	13	0,964	181,6		180	75	
	12 56	4,600	12	0,967	182,3		242	100	
	1 57	4,560	12	0,979	179,6		303	125	
	2 54	4,540	12	1,035	171,5		360	150	
	3 57	4,490	12	0,982	176,2		423	175	
4. X.	8 36	3,500	12	0,817	178,8		vorher		
	8 46	3,541	12	0,841	183,8		„		
	9 48	4,154	12	0,988	184,5		61	25	
	10 48	3,680	13	0,924	177,8		121	50	
	11 50	4,038	14	0,974	180,4		183	75	
	12 48	4,026	14	0,987	178,0		241	100	
	1 51	4,320	14	1,045	179,9		304	125	
	2 54	4,112	13	1,050	174,3		367	150	

Untersuchungen über den Einfluß von Keimdrüsenpräparaten auf den Stoffwechsel geschlechtsnormaler Tiere, beobachtet am Harnquotienten C:N.

Von

Fritz Gleichmann.

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 18. Oktober 1927.)

Daß die Keimdrüsen einen zweifellosen Einfluß auf den Stoffwechsel haben, nämlich Steigerung desselben bewirken, desgleichen die aus ihnen hergestellten organtherapeutischen Präparate, geht aus zahlreichen Beobachtungen hervor [(1) bis (10)]. Trotzdem fehlt es nicht an vereinzelten Gegenstimmen, die eine Stoffwechselwirkung nicht beobachteten, so z. B. *Lüthje* (11). Das braucht jedoch nicht gegen eine tatsächliche Wirkung zu sprechen, da ja z. B. auch nur etwa bei 50 % aller Frauen im Klimakterium sich der Ausfall der Keimdrüsen durch eine Oxydationsverminderung bemerkbar macht. Es liegt mir fern, eine umfassende Darstellung der Frage zu geben, sondern ich will nur in aller Kürze die zurzeit noch schwebenden Probleme streifen.

Heute noch stark umstritten ist, ob die Keimdrüsen und die daraus hergestellten Präparate nur auf den Kohlehydrat- und Fettumsatz wirken, oder auch, ähnlich der Thyreoidea, den Eiweißstoffwechsel mit einbeziehen.

Gegen eine Beteiligung des Eiweißes am Umsatz sprechen sich unter anderen *Loewy* und *Richter* (12) aus, die annehmen, daß die Erhöhung der N-Ausfuhr bei Fütterung von Keimdrüsensubstanz lediglich der N-Mehrzufuhr parallel geht. Auf ähnlichem Standpunkt steht *Biedl* (6), wenn er auch die Frage in seinem Referat vom Stoffwechselkongreß (6) 1925 neuerdings zum mindesten offen läßt. Desgleichen spricht sich unter anderen *Thumin* (13) gegen eine Eiweißbeteiligung aus, da er bei einem kastrierten Patienten sogar Stickstoffansatz während täglicher Verabreichung von 15 Oophorintabletten beobachtete. Zu bemerken ist dazu, daß dies ein einzelner Versuch ist, und daß 15 Tabletten für einen Erwachsenen zur Erzielung einer deutlich einwandfreien Wirkung keine große Dosis sind. Ferner kann, wie auch aus meinen Versuchen (s. unten) hervorgeht, leicht

durch sekundäre Gründe eine Verdeckung der Wirkung stattfinden, die sogar zu einer N-Retention führen kann.

Für eine Beteiligung des Eiweißstoffwechsels in steigerndem Sinne spricht sich unter anderen *Senator* (14) aus. Er fand nach Oophoringaben in einigen pathologischen Fällen Erhöhung der N-Ausfuhr; sodann *Neumann* und *Vos* (51). Sie beobachteten bei einer kastrierten Hündin, daß während der Tage der Ovarienmedikation eine deutliche Steigerung der N-Ausfuhr gegenüber der N-Einfuhr statthatte. Dasselbe fanden sie bei geschlechtsreifen normalen Tieren (s. unten). In letzter Zeit sprachen sich ebenfalls für eine Beteiligung des Eiweißstoffwechsels *G. N. Bogoslowski* und *W. G. Korentschewski* (16) aus. Sie injizierten in acht Versuchen an fünf Hunden nach zwei- bis dreitägiger Vorperiode während einer zweitägigen Hauptperiode je 10 ccm einer Drüsenemulsion, die aus 5 g Drüsensubstanz im Augenblick zuvor getöteter Hunde gewonnen war. Sie fanden eine Steigerung vor allem des Eiweißstoffwechsels bis zu 18%, wobei sie noch einen Synergismus bei gleichzeitiger Zufuhr von Prostatasubstanz feststellten. Eine eintägige Nachperiode schloß die Versuche ab. *Wada* (17) fand bei einem weiblichen geschlechtsgesunden Kaninchen auf subkutane Injektion einer von frischen Ovarien gewonnenen Fettfraktion (s. unten) ebenfalls eine deutliche Steigerung der N-Ausfuhr. Bei diesen Versuchen *Korentschewskis* und *Wadas* läßt sich immerhin einwenden, daß allein der Reiz der parenteral zugeführten artfremden Stoffe genüge, um eine gesteigerte N-Ausfuhr hervorzurufen. Dies ist möglich, mir aber unwahrscheinlich, da außerdem die Injektion bei dem männlichen *Wada*schen Kaninchen ohne Einfluß auf den Umsatz N-haltiger Stoffe blieb.

Gleichfalls umstritten ist die Frage, ob die Keimdrüsenzufuhr nicht nur auf Tiere mit gestörter Geschlechtsfunktion, sondern schon auf normale, geschlechtsgesunde Tiere von Einfluß ist, sowohl nur hinsichtlich des Kohlehydrat-Fettstoffwechsels wie auch einbezüglich des Eiweißumsatzes.

Richter und *Loewy* (12) verneinen eine Erhöhung des Ruhegaswechsels beim gesunden Tiere. Allerdings läßt sich aus dem Gaswechsel allein nicht auf eine tatsächlich doch stattfindende Änderung der Stoffwechsellage schließen. Sie fordern als Ideal einer Substitutionstherapie, daß sie beim gesunden Individuum ohne Wirkung sei.

Für die Wirkung auch auf geschlechtsreife Individuen sprechen unter anderen die Versuche von *Neumann* und *Vos* (s. oben), die bei zwei geschlechtsgesunden Tieren nach Ovariengabe eine mäßige Steigerung der N-Ausfuhr fanden gegenüber der N-Einfuhr, und anderes mehr.

Wirkt der Ovarienstoff auch auf männliche Individuen und umgekehrt Hoden auch auf weibliche, und wo ist ihr Angriffspunkt und ihre Bildungsstätte?

Loewy und *Richter* beobachteten bei Fütterung von Ovariensubstanz sowohl bei weiblichen wie bei männlichen Tieren eine Stoffwechselsteigerung im Gaswechselversuch; dagegen war die Hodensubstanz nur auf männliche Tiere von Einfluß. Im allgemeinen scheint die Hodensubstanz durchweg in der Wirkung etwas schwächer zu sein; zudem sind die Präparate nicht immer gleich hinsichtlich ihrer Güte. Eine bestimmt umschreibbare, spezifische, wenn auch heute noch nicht hinsichtlich ihrer Zusammen-

setzung bekannte einheitliche Substanz muß der Stoffwechselwirkung zugrunde liegen, wie aus der Austauschbarkeit der Keimdrüsenstoffe vom Menschen auf das Tier und vom Tier auf den Menschen, sowie aus der Beeinflussung männlicher Tiere durch weibliche Drüsenstoffe und umgekehrt hervorgeht. — Anatomisch scheint dieser Stoff nach den neueren Untersuchungen von *B. Zondek* und *S. Aschheim* wenigstens bei den Ovarien geklärt zu sein (18). Dagegen ist die Bildungsstätte des Hormons im Hoden noch sehr umstritten, ob in den Zwischenzellen oder im generativen Apparat. — Wo diese Stoffe ferner angreifen bei der Beeinflussung des Stoffwechsels, ob an den nervösen Endorganen, oder zentral, ob durch Elektrolytlagenänderung, durch Angriff an anderen innersekretorischen Organen (zum Beispiel Thyreoidea, Hypophyse) oder lediglich durch Verschiebung des innersekretorischen Gleichgewichts oder durch direkten Angriff an der einzelnen Zelle, ist eine sehr wenig eindeutig zu beantwortende Frage. Wahrscheinlich wird auch hier der Angriffspunkt an verschiedenen Stellen gemeinsam oder abwechselnd zu suchen sein.

Bevor ich zu den Ergebnissen meiner Versuche komme, seien noch etliche Worte über den Harnquotienten C : N und die Methodik gesagt. Der Harnquotient gibt bekanntlich eine Übersicht über das Verhältnis des C-Umsatzes, soweit dieser als dysoxydabler Harn-C zur Ausscheidung gelangt, zum gesamten N-Umsatz. Das Wesen dieses Verhältnisses liegt in seiner ungefähren Konstanz, im Durchschnitt mehrtägiger Versuchsperioden beim Menschen, wie bei den verschiedenen Tierfamilien und im besonderen bei jedem einzelnen Individuum, sofern die Nahrung die gleiche ist hinsichtlich des Verhältnisses ihrer Zusammensetzung. Dabei sind die absoluten Mengen der verzehrten Nahrung insoweit belanglos, als nicht dadurch eine Unterernährung oder Hunger zustande kommt bzw. nicht ein zu starker Gewichtsansatz. Alles Nähere ist bei *Bickel* und *Kauffmann-Cosla* (19) in dem Aufsatz „Zur pathologischen Physiologie und Klinik der dysoxydativen Carbonurie“ zu finden, sowie in einem Vortrag von *Bickel* (20). Aber zwei Punkte möchte ich noch kurz berühren, nämlich das Verhalten des Quotienten bei Unterernährung mit Gewichtsverlust, sowie sein Verhalten bei Überernährung mit Gewichtsansatz. Bei Unterernährung mit absolutem Hunger findet in der Regel bei *Kaninchen und Pflanzenfressern* Quotientsenkung [*Rubner* (21)] statt. Sie ist im wesentlichen bedingt durch eine Abnahme des dysoxydablen Harn-C (s. Kaninchen II), bei annähernd konstantem oder nur mäßig gesenktem N. Erst praemortal findet eine Steigerung der N-Ausfuhr statt, deren zeitlicher Eintritt vom jeweiligen Fettpolster des Tieres abhängt. Dagegen beobachtet man bei Überernährung mit gleichzeitigem stärkeren Gewichtsansatz beim Pflanzenfresser eine Quotienterhöhung, erzeugt bei Steigerung oder Gleichbleiben der dysoxydablen C-Werte durch Abnahme der N-Werte (N-Retention, Eiweißansatz, „Wachstumsquotient“) s. unter anderen Kaninchen III (männlich).

Zur Methodik. Die Tiere befanden sich im Stoffwechselkäfig und hatten durchweg eine fünf- oder mehrtägige Vorperiode, an die sich eine Hauptperiode und Nachperiode von etwa gleicher Dauer anschlossen. Als Futter erhielten die Tiere Runkelrüben, vom 2. Juli 1926 ab frische Mohrrüben, alles jeweils in einer solchen Menge, daß am folgenden Tage vom Vortage immer noch ein geringer Futterrest vorhanden war. In den Hauptperioden bekamen sie täglich drei Tabletten Oophorin bzw. drei bis fünf Tabletten Testiphorin, die nach vorheriger Zerkleinerung im Mörser den Tieren unter Zufügung von etwa 30 ccm Wasser durch die Schlundsonde verabreicht wurden. Der Stickstoff ward nach *Kjeldahl,* der C nach der in der Arbeit von *Gomez* (22) angegebenen Methode bestimmt. Sämtliche Analysen wurden doppelt ausgeführt. Das Oophorin und Testiphorin war von *Freund* und *Redlich* (*Kahlbaum*) bezogen worden.

Zunächst betrachten wir den Einfluß des weiblichen Keimdrüsenstoffes (Oophorin-*Kahlbaum*). Bereits *Wada* (17) hatte bei einem weiblichen geschlechtsnormalen Kaninchen eine Quotientsenkung beobachtet auf subkutane Einverleibung eines dem Oophorin entsprechenden Ovarienspritzpräparates[1] (s. oben). Die Wirkung beruhte auf Zunahme der absoluten N-Ausfuhr bei gleichzeitig geringem Sinken der absoluten C-Ausfuhr. (Dabei scheint die C-Abnahme nach meiner Ansicht vor allem eine Folge der geringen Körpergewichtsverminderung zu sein.) Dagegen blieb dasselbe Präparat bei einem männlichen Tier ohne Einfluß. *Wada* schloß daraus auf eine Verbesserung der Oxydationen im intermediären Stoffwechsel.

Ich untersuchte durchweg den Einfluß *peroraler* Oophoringabe, zunächst an zwei normalen weiblichen Kaninchen, da die orale Zufuhr die gebräuchliche therapeutische Anwendungsart des Präparates ist.

Kaninchen II (weiblich) zeigt während der Hauptperiode Quotientsenkung, die wesentlich auf der Erhöhung der N-Ausfuhr beruht, deren Höhe in der Nachperiode wieder stark zurückgeht (ähnlich dem weiblichen *Wada*schen Tier). Dabei sinkt die C-Ausscheidung ungefähr parallel dem Gewichtsverlust des Tieres (s. oben S. 295). Um gleich vorweg den Einwand zu entkräften, die Mehrausscheidung an N sei lediglich auf die Mehrzufuhr an in dem Präparat enthaltenen N zurückzuführen, wurde später ein Kontrolltier, Kaninchen XI, angesetzt, das täglich eine Mehrzufuhr an Stickstoff erhielt, die dem Durchschnittsgehalt von drei Oophorintabletten entsprach[2].

[1] Das „Oophorin-Lipoid" stellt eine Fettfraktion der Ovarien dar, in denen nach *Allen, Doisy* und *Johnston* die besonders wirksamen Stoffe enthalten sind, während das Oophorin ein Trockenpräparat der peinlich präparierten, lebensfrischen Eierstöcke ist.

[2] Eine Oophorintablette hatte einen Durchschnittsgehalt von 0,1427 g N, drei Tabletten also 0,4281 g N. Eine Testiphorintablette enthielt 0,0497 g N im Durchschnitt, drei bis fünf Tabletten also 0,1491 bis 0,2485 g N.

Das Kontrolltier erhielt zu diesem Zweck annähernd quantitativ 2,5 g getrockneten Pferdefleisches mit durchschnittlich 0,490 g N. Das Fleisch war vor der Trocknung mit destilliertem Wasser gekocht und wurde getrocknet — nach Zerreibung im Mörser — dem Tier in obiger Art mit der Schlundsonde bzw. mit dem Mauleisen verabreicht. Dabei blieb die N-Ausscheidung im Harn auf etwa gleicher Höhe mit der Vorperiode (das Sinken um etwa 4 % liegt innerhalb der Fehlergrenzen), während die C-Ausscheidung gleich blieb, ebenso praktisch auch der Quotient. Also ist die Mehrausscheidung an N bei Kaninchen II (weiblich) und allen späteren Tieren anscheinend *nicht* ein Ergebnis der Mehrzufuhr, sondern kann nur durch stärkere Beteiligung der stickstoffhaltigen Stoffe am Umsatz infolge der Keimdrüsenpräparate zu beziehen sein.

Bei dem männlichen Kaninchen IV trat ebenfalls eine Quotientsenkung zutage (bei täglicher Gabe von drei Tabletten Oophorin). In der Nachperiode deutlicher Rückanstieg. Die Senkung in der Hauptperiode ist durch N-Mehrausscheidung bei gleichzeitig geringer C-Abnahme hervorgerufen. Die C-Abnahme erstreckt sich auch auf die Nachperiode und ist mit leichter Körpergewichtsverminderung verknüpft, welche vielleicht Folge einer gleichzeitigen Unterernährung ist, bei der (s. S. 295 und 296) eine Verringerung der absoluten C-Ausscheidung meist mit Gleichbleiben oder geringerem Fallen der N-Werte verbunden ist. Während bei unserem Tier gerade die N-Ausscheidung in der Hauptperiode steigt, also anscheinend als Wirkung des Keimdrüsenstoffes zu betrachten ist. Wieweit ferner die Senkung der C-Werte in der Hauptperiode nur auf Hunger bzw. auf eine etwaige Mehroxydierung von Kohlehydraten und Fetten durch den Keimdrüsenstoff zurückzuführen ist, läßt sich hier, sowie in den späteren Fällen nicht entnehmen, zumal außerdem vermehrte Eiweißendprodukte noch an ihrem Teil zu einer Verschleierung der Verhältnisse beitragen können. Jedenfalls ist aber die Keimdrüsenzufuhr viel zu gering und zu kurzwährend, um ihrerseits einen sicher meßbaren Körpergewichtsabfall der Versuchstiere zu bewirken; und zum anderen konnten ja auch die Tiere in sämtlichen Versuchen beliebig viel fressen.

Betrachten wir nun Kaninchen III (männlich), einen ebenfalls mit Oophorin behandelten Bock, so ist zu bemerken, daß dieses Tier bereits genau 8 Tage zuvor eine 6tägige Testiphorinfütterung hinter sich hatte (s. unten). Es ist als einziges Tier zu einem Doppelversuch verwandt worden. Daher war es in seiner Stoffwechsellage bereits bekannt. Um so mehr versetzte es in Erstaunen, als das Tier in der Hauptperiode statt mit einer Quotientsenkung mit einer Quotienterhöhung antwortete. Dasselbe war bei dem gleichzeitig im Versuche befindlichen Kaninchen VI (männlich, Testiphorin) der Fall. Die Er-

höhung hielt noch in der Nachperiode an und wurde durch Senkung der N-Ausfuhr bei gleichzeitig stetig zunehmender beträchtlicher Steigerung der C-Ausfuhr verursacht. Aus einem Kontrollversuche ging hervor, daß der Grund der plötzlichen Quotienterhöhung in dem Übergang der Fütterung von vorjährigen zu frischen Mohrrüben lag, der am 2. Juli aus anderweitigen technischen Gründen vor sich gehen mußte, da dem Institut die Beschaffung frischer Mohrrüben zuvor unmöglich war. Die Störung war also stärker, als daß sie durch Oophorin und bei Kaninchen VI durch Testiphorin sichtbar beeinflußt worden wäre. Eine Erklärung zur Erhöhung liegt in der besseren, reichlicheren Nahrungsaufnahme der Tiere und anschließender Körpergewichtszunahme. Der ganze Stoffumsatz ist belebt, N wird wohl retiniert, er sinkt jedenfalls im Harn, und infolge der Überernährung mit Kohlehydraten wird trotz vielleicht insgesamt quantitativ gesteigerter Oxydation, doch die Güte der Oxydation herabgesetzt, die C-Ausscheidung im Harn steigt. Das beobachteten *Rubner*, *Heubner*, *van Ordt*, *Langstein*, *Steinitz* u. a. [zit. nach (19)]. Sie fanden, daß beim gesunden Brustkinde in hervorragender Weise von der Erhöhung oder Erniedrigung des in der Nahrung enthaltenen C-Gehaltes die Lage des Harnquotienten abhängig war, wobei nicht ersichtlich ist, wieweit die absoluten Mengen der C-Ausscheidung beteiligt sind, und ob sie überhaupt verändert sind. *Rubner* fand die Quotientsteigerung bei vornehmlicher Kohlehydraternährung sowohl beim Menschen wie in Tierversuchen.

Wir kommen jetzt zu den Testiphorinversuchen und betrachten zunächst die Wirkung auf männliche Tiere.

Kaninchen V (männlich) läßt deutliche Quotientsenkung erkennen. Sie ist diesmal nicht durch eine Steigerung der N-Ausfuhr im Harn hervorgerufen — der N bleibt in der Hauptperiode völlig unbeeinflußt, sinkt später ein wenig in der Nachperiode —, sondern durch eine beträchtliche Senkung der C-Ausscheidung, die aber in der Nachperiode wieder etwas ansteigt. Die vor allem auf die Vorperiode im wesentlichen beschränkte Gewichtsabnahme des Tieres müßte eher eine Beschränkung der C-Ausfuhr (*Rubner*) nach sich ziehen, also in unserem Falle der C-Wert der Vorperiode niedriger sein, als der der Hauptperiode. Es liegt also hier anscheinend eine verstärkte Oxydation vor allem der C-reichen, N-freien Substanzen vor.

Kaninchen VI (männlich) bot wieder die eigentümliche Quotienterhöhung infolge des frischen Futters (s. oben), die trotz der Testiphorinmedikation stattfand.

Bei Kaninchen VII, ebenfalls einem Bock, sank in den ersten 4 Tagen der Vorperiode das Körpergewicht von 2800 g auf 2530 g. Ich möchte daher nur die letzten 4 Tage der Vorperiode verwerten. Zu

bemerken ist, daß der Quotient nur um ein geringes in der Hauptperiode sinkt, um in der Nachperiode beträchtlich zu steigen. Die Tieflage in der Vorperiode erfolgt wohl im wesentlichen durch stärkere Oxydation des C-Materials infolge der Unterernährung. In der Hauptperiode steigt unter der Testiphoringabe der Harn-N wesentlich an, desgleichen auch etwas der Harn-C bei verbesserter Ernährungslage, wobei es unsicher ist, ob die Erhöhung im wesentlichen auf Steigerung der C-haltigen Abbauprodukte des Eiweißes zurückzuführen ist oder auf die verbesserte Ernährungslage. In der Nachperiode sinkt der C auf die ungefähre Höhe der Vorperiode unter gleichzeitigem starken Sinken der N-Ausscheidung. Also auch hier während der Testiphoringaben deutliche N-Mehrausscheidung, während die C-Ausscheidung etwas steigt, ihre Ursachen nicht einwandfrei zu überblicken sind.

Betrachten wir noch das junge männliche Kaninchen X, bei dem noch kein descensus testiculorum wahrzunehmen war! Es findet in der Hauptperiode unter Testiphorinzufuhr eine deutliche geringe Quotientsenkung statt, die auf einer stärkeren N-Ausfuhr beruht, aber durch ein gleichzeitiges Steigen der C-Werte nicht so offensichtlich zum Ausdruck kommt. [Es ist nicht nötig, daß bei erhöhter N-Ausscheidung während der Verabreichung der Keimdrüsenstoffe die Tiere eine deutliche Gewichtsabnahme zeigen müssen (s. oben), da der Einfluß zu gering und kurzdauernd ist und zum anderen die Tiere in sämtlichen Versuchen beliebig viel fressen konnten.]

Zum Schluß gab ich noch zwei weiblichen Tieren Testiphorin. Das eine Kaninchen, Tier VIII, hatte seit dem 2. Juli, also schon 2 Tage vor der Vorperiode, frisches Rübenfutter erhalten (s. oben). Die Folge ist ein während der Vorperiode, sowie an dem ersten Tage der Hauptperiode noch hochgelegener Quotient, der aber während der Testiphoringaben in der Hauptperiode rasch sinkt infolge starken Anstieges der N-Ausfuhr unter gleichzeitig mäßigem Anstieg der C-Werte. In der Nachperiode entspricht im wesentlichen die Lage des Quotienten der der Hauptperiode. Es ist leider nicht mit Bestimmtheit einwandfrei ersichtlich, inwieweit die Senkung des Quotienten auf Rechnung eines natürlichen Abfalles wegen der Gewöhnung an das Futter zu setzen ist, inwieweit auf die Testiphorinzufuhr. Doch ist zu bemerken, daß 1. der Quotient plötzlich mit Einsetzen der Testiphoringaben sinkt und dann ungefähr gleiche Lage behält, 2. daß bei den anderen Tieren die Quotienterhöhung durchschnittlich 14 bis 15 Tage nach Beginn der frischen Fütterung anhielt, während bei diesem Tier der Abfall plötzlich am elften Tage mit Beginn der Testiphoringabe ungefähr zusammen fällt. Einer solchen Auslegung entspricht auch die völlig gleiche Lage der Quotient- und absoluten C- und N-Werte der Nachperiode, gegenüber der Hauptperiode. Man muß annehmen, daß in diesem Falle die Quotientsenkung



der Hauptperiode infolge der relativen Hochlage des Quotienten der Vorperiode nicht so zum Ausdruck kommen konnte. Was das Steigen des Körpergewichts anbelangt, so ist die Lage ungefähr die wie beim wachsenden, vorzüglich und reichlich mit Kohlehydrat genährten Säugling (s. oben); relativ starke Ausscheidung von dysoxydablem C, da eine Oxydation bis zu den letzten Abbaustufen der Kohlehydrate nicht stattfindet.

Der Einfluß des Testiphorins bei dem anderen weiblichen Tier, IX, ist bedeutend offensichtlicher. Der Quotient sinkt infolge etwa 40 %iger N-Ausfuhrerhöhung in der Hauptperiode, um in der Nachperiode wieder zu steigen bei gleichzeitigem Fallen der N-Werte, die nicht völlig die Höhe der Vorperiode erreichen. Auch die C-Ausfuhr steigt, doch nur um annähernd 20 %, um in der Nachperiode ebenfalls ein wenig unter den Wert der Vorperiode zu sinken, was anscheinend auf den geringen Gewichtsverlust von 70 g zurückzuführen ist. Die Steigerung der C-Werte während der Hauptperiode beruht auch hier anscheinend wesentlich auf dem C vermehrter kohlenstoffreicher Eiweißabbauprodukte.

Ehe ich zum Schluß komme, möchte ich noch bemerken, daß diesen wenigen Untersuchungen, die nur ein Glied in der Kette der Erforschung der Keimdrüsenstoffe und ihrer therapeutischen Wertung sind, aus anderwertigen Gründen nicht weitere Kontrollversuche mit N-Zufuhr nicht-hormonaler Stoffe (s. Kaninchen XI) zur Seite gestellt werden konnten. Ist die Deutung der Ergebnisse nicht immer einwandfrei zu erzielen, da wir ja nie den Vorgang, sondern immer nur die Resultate des Geschehens überblicken, so lassen sich dennoch nochmals kurz zusammengefaßt ungefähr die folgenden Grundlinien erkennen:

1. Oophorin und Testiphorin haben auch beim normalen gesunden Tier einen Einfluß auf den Stoffwechsel, der sich in Senkung des Verhältnisses C : N äußert — die Versuche Kaninchen VI und III bleiben wegen sekundärer Störung (Futterwechsel mitten im Versuch) hier unberücksichtigt.

2. Diese Senkungen beruhen vorwiegend sowohl bei Oophorin wie Testiphorin auf Umsatzsteigerung der stickstoffreichen Substanz, können aber auch, wie Fall V schließen läßt, durch Oxydationserhöhung der N-freien C-haltigen Substanz bedingt sein. So erklären sich wohl auch die zum Teil widersprechenden Meinungen in der Literatur.

3. Oophorin und Testiphorin sind anscheinend grundsätzlich hinsichtlich der Richtung ihrer Wirkung gleich zu bewerten. Über den Grad müssen umfangreichere Untersuchungen Aufschluß geben.

4. Oophorin und Testiphorin wirken auch auf den Stoffwechsel gegengeschlechtlicher Tiere.

Protokolle.

Kaninchen II, ♀. Oophorin.

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	C g		N g		C : N		Bemerkungen
23. V.	2460	215	1,134		0,572		1,983		
25. V.	2500	510	1,897		1,856		1,022		
26. V.	2400	470	1,567	1,746*	1,119	1,515	1.398	1,152 [1,313]***	
27. V.	2400	405	1,524		1,276		1,194		
28. V.	2400	820	2,612		2,698		0,968		
29. V.	2290	450	1,977		2,016		0,981		
30. V.	2200	485	1,953		2,241		0,872		
31. V.	2200	490	—		1,680		—		
1. VI.	2150	360	—	1,581	—	1,817	—	0,870 [0,865]	3 Tabletten Oophorin
2. VI.	2150	390	1,306		1,502		0,870		
3. VI.	2100	310	1,254		1,628		0,770		
4. VI.	1910	450	1,416		1,702		0,834		
5. VI.	2000	520	1,418		1,674		0,858		
6. VI.	1860	430	1,287	1,251	1,385	1,293	0,929	0,967	
7. VI.	1970	420	1,150		1,058		1,086		
8. VI.	1960**	430	1,152		1,053		1,093		

Kaninchen III, ♂. Oophorin.

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	C g		N g		C : N		Bemerkungen
30. VI.	2450	390	0,870		0,655		1,328		
1. VII.	2460	570	1,181		0,798		1,606		
2. VII.	2500	510	1,163	1,083	0,750	0,721	1,551	1,502 [1,530]	
3. VII.	2500	610	1,121		0,683		1,641		frische Mohrrüben
4. VII.	2490	550	0,894		0,616		1,451		
5. VII.	2510	540	1,084		0,680		1,593		
6. VII.	2440	600	1,234		0,672		1,836		
7. VII.	2610	520	1,546		1,019		1,517		
8. VII.	2660	710	1,216	1,406	1,596	0,651	2,039	2,159 2,250	3 Tabletten Oophorin
9. VII.	2610	710	1,681		0,646		2,601		
10. VII.	2600	660	1,746		0,508		3,437		
11. VII.	2600	590	1,554		0,578		2,690		
12. VII.	2610	650	1,695		0,546		3,092		
13. VII.	2600	610	1,464		0,598		2,449		
14. VII.	2550	590	1,200		0,578		2,076		
15. VII.	2640	690	1,569	1,547	0.917	0,812	1,710	1,905 [1,967]	
16. VII.	2610	760	1,857		0,904		2,053		
17. VII.	2650	760	1,646		1,064		1,547		

* Die Periodendurchschnittswerte sind mit fetten Ziffern gesetzt.

** Die Tiere fraßen die im Institut überwinterten Runkelrüben nur ungern.

*** Die eckig geklammerten Zahlen geben die Durchschnittswerte der einzelnen summierten Harnquotienten an, während die nicht geklammerten Zahlen die Harnquotienten C : N darstellen, die aus dem jeweiligen Mittel der einzelnen C- und N-Perioden gebildet wurden, hier z. B. 1,746 : 1,515 = 1,152.

Kaninchen IV, ♂. Oophorin.

Datum	Körpergewicht g		Harnmenge ccm	C g		N g		C:N		Bemerkungen
16. VI.	1770		270	0,729		0,491		1,463		
17. VI.	1750		420	1,033		0,588		1,757		
[18. VI.	1760]	1770	[350]	[0,987]	0,888	[0,294]	0,503	[3,357]	1,555	
19. VI.	1780		450	1,058		0,567		1,848	[1,546]	
20. VI.	1780		410	0,633		0,574		1,119		
21. VI.	1780		290	0,688		0,629		1,090		
22. VI.	1720		290	0,688 (!)		0,568		1,210		
23. VI.	1660	1680	310	1,085	0,813	0,825	0,736	1,315	1,104	3 Tabletten Oophorin
24. VI.	1700		320	0,864		0,896		0,965	[1,108]	
25. VI.	1610		210	0,722		0,706		1,022		
26. VI.	1670		270	0,831		0,794		1,046		
28. VI.	1640		310	0,705		0,564		1,250		
29. VI.	1640		280	0,855		0,823		1,039		
30. VI.	1630	1650	250	0,618	0,633	0,542	0,489	1,138	1,294	
1. VII.	1670		250	0,483		0,287		1,676	[1,379]	
2. VII.	1660		200	0,395		0,266		1,484		
3. VII.	1660		270	0,742		0,454		1,635		

Kaninchen V, ♂. Testiphorin.

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	C g		N g		C:N		Bemerkungen
14. VI.	2680	340	1,2147		0,714		1,701		
15. VI.	2600	590	1,474		0,876		1,683		
16. VI.	2600	590	1,762	1,440	1,156	1,008	1,524	1,429	
17. VI.	2600	530	1,304		1,179		1,106	[1,458]	
18. VI.	2520	490	1,382		0,961		1,438		
19. VI.	2560	460	1,506		1,159		1,298		
20. VI.	2560	440	1,250		0,986		1,268		3 Tabl. Testiphorin
21. VI.	2560	520	0,970		0,837		1,170		3 „ „
22. VI.	2500	500	1,085	1,102	1,120	1,009	0,969	1,091	3 „ „
23. VI.	2500	510	0,963		0,928		1,037	[1,121]	5 „ „
24. VI.	2510	660	1,231		1,201		1,158		5 „ „
25. VI.	2510	520	1,109		0,983		1,128		3 „ „
26. VI.	2500	540	1,108		1,020		1,085		
27. VI.	2500	580	1,424		0,812		1,754		
28. VI.	2510	620	1,755	1,252	0,992	0,838	1.769	1,495	
30. VI.	2450	390	0,870		0,655		1,328	[1,514]	
1. VII.	2460	570	1,181		0,798		1.606		
2. VII.	2490	510	1,163		0,750		1,551		

Kaninchen VI, ♂. Testiphorin.

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	C g		N g		C : N		Bemerkungen
29. VI.	2500	490	1,140		0,755		1,510		
30. VI.	2390	420	0,894		0,823		1,086		
1. VII.	2400	650	1,506	1,208	1,092	0,836	1,461	1,446	
2. VII.	2380	520	1,230		0,764		1,739	[1,502]	
3. VII.	2380	590	1,274		0,743		1,714		
4. VII.	—	—	—		—		—		
5. VII.	2400	—	—		—		—		
6. VII.	2370	510	1,035		0,571		1,818		
7. VII.	2570	500	1,435		1,050		1,366		
8. VII.	2330	620	1,021	1,090	0,608	0,568	1,680	1,910	5 Tabletten Hodentestiphorin
9. VII.	2400	570	1,097		0,542		2,025	[2,071]	
10. VII.	2410	450	1,151		0,378		3,045		
11. VII.	2510	630	1,296		0,441		2,937		
12. VII.	2500	440	0,595 (1)		0,400		1,487		
13. VII.	2510	500	1,036		0,595		1,775		
14. VII.	2500	475	0,759		0,532		1,275	1,807	
15. VII.	2590	470	0,954	1,196	0,461	0,662	2,070		
16. VII.	2510	690	1,694		0,869		1,948	[1,772]	
17. VII.	2540	510	1,538		0,857		1,794		

Kaninchen VII, ♂. Testiphorin.

Datum	Körpergewicht g		Harnmenge ccm	C g		N g		C : N		Bemerkungen
23. VII.	2800		415	1,137		0,755		1,507		
24. VII.	2690		320	1,148		0,851		1,349		
25. VII.	2530		275	1,364		1,386		0,984		
26. VII.	2590	2580	265	1,333	1,305	1,336	1,197	0,998	1,090	
27. VII.	2530		340	1,309		1,047		1,252	[1,142]	
28. VII.	2550		320	1,405	1,365	1,299	1,287	1,159	1,067	
29. VII.	2500		300	1,473		1,470		1,002		
30. VII.	2430		315	1,271		1,432		0,887		
31. VII.	2450		360	1,533		1,523		1,006		
1. VIII.	2460		460	1,655		1,610		1,021		
2. VIII.	2450		500	1,398		1,610		0,868	1,000	5 Tabl. Testiphorin
3. VIII.	2500	2490	470	1,133	1,468	1,480	1,466	0,900	[1,006]	
4. VIII.	2480		—	—		—		—		
5. VIII.	2550		460	1,578		1,417		1,114		
6. VIII.	2550		460	1,311		1,159		1,130		
7. VIII.	2560		370	1,143		0,881		1,298		
8. VIII.	2560	2510	380	1,347	1,315	0,958	0,913	1,406	1,494	
9. VIII.	2430		370	1,600		1,036		1,545	[1,439]	
10. VIII.	2490		370	1,171		0,777		1,506		

Kaninchen VIII, ♀. Testiphorin.

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	C g		N g		C : N		Bemerkungen
4. VII.	1660	350	0,682		0,392		1,738		
6. VII.	1700	420	0,749		0,470		1,593		
7. VII.	1700	400	1,100		0,532		2,066		
8. VII.	1690	410	0,928	**0,865**	0,545	**0,459**	1,701	**1,880** [1,898]	
9. VII.	1710	340	0,842		0,381		2,210		
10. VII.	1720	360	0,844		0,504		1,675		
11. VII.	1750	460	—		—		—		
12. VII.	1750	400	0,905		0,392		2,309		
13. VII.	1740	310	0,896		0,434		2,065		
14. VII.	1700	450	1,303		0,945		1,379		
15. VII.	1740	340	0,909	**1,077**	0,643	**0,746**	1,414	**1,443** [1,504]	5 Tabletten Testiphorin
16. VII.	1770	520	1,364		1,019		1,338		
17. VII.	1750	410	0,912		0,689		1,324		
18. VII.	1710	430	1,172		0,843		1,391		
19. VII.	1740	420	1,049		0,706		1,487		
20. VII.	1810	440	1,048	**1,037**	0,708	**0,724**	1,480	**1,430** [1,434]	
21. VII.	1820	425	1,050		0,773		1,358		
22. VII.	1810	470	0,863		0,592		1,456		

Kaninchen IX, ♀. Testiphorin.

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	C g		N g		C : N		Bemerkungen
17. VI.	1650	310	0,991		0,512		1,856		
18. VI.	1650	120	0,460		0,336		1,369		
19. VI.	1600	360	0,872	**0,715**	0,806	**0,543**	1,081	**1,316** [1,396]	
20. VI.	1580	260	0,847		0,564		1,500		
21. VI.	1650	270	0,523		0,605		0,864		
22. VI.	1650	260	0,600		0,437		1,373		
23. VI.	1650	370	0,792		0,829		0,955		5 Tabl. Testiphorin
24. VI.	1630	430	1,231		1,154		1,067		5 " "
25. VI.	1730	340	0,595	**0,936**	0,571	**0,912**	1,042	**1,026** [1,023]	5 " "
26. VI.	1600	460	1,127		1,095		1,029		4 " "
27. VI.	1620	420	—		—		—		4 " "
28. VI.	1640	220	0,449		0,339		1,326		
29. VI.	1640	210	0,553	**0,589**	0,470	**0,471**	1,176	**1,250** [1,234]	
30. VI.	1550	360	0,766		0,605		1,200		
1. VII.	1580	370	—		—		—		
[2. VII.	1660	350	0,734	**0,803**	0,392	**0,416**	1,874	**1,930**	Mit frischen Mohrrüben gefüttert
3. VII.]	1660	300	0,888		0,441		2,012		

Kaninchen X, ♂. Testiphorin.

Datum	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	C g		N g		C : N		Bemerkungen
16. VI.	1650	100	0,972		0,504		1,928		
17. VI.	1650	310	0,921		0,738		1,249		
18. VI.	1610	210	0,497	0,803	0,294	0,559	1,690	1,436 [1,488]	
19. VI.	1650	380	0,813		0,638		1,272		
20. VI.	1650	370	0,809		0,622		1,301		
21. VI.	1700	310	0,818		0,499		1,639		3 Tabletten Testiphorin
22. VI.	1680	430	0,811		0,662		1,225		3 Tabletten Testiphorin
23. VI.	1700	440	0,986	0,961	0,862	0,701	1,143	1,371 [1,389]	5 Tabletten Testiphorin
24. VI.	1630	460	0,941		0,656		1,436		5 Tabletten Testiphorin
25. VI.	1640	470	1,128		0,789		1,428		5 Tabletten Testiphorin
26. VI.	1670	440	1,080		0,739		1,460		3 Tabletten Testiphorin
27. VI.	—	420	—		—		—		

Kaninchen XI. Stickstoffkontrolltier.

Datum 1926	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	C g		N g		C : N		Bemerkungen
8. XII.	2300	340	—		[0,881]		—		
9. XII.	2300	255	—		[0,729]		—		
10. XII.	2300	220	0,668		0,370		1,888		
11. XII.	2200	250	0,845		0,485		1,774		
12. XII.	2250	360	1,213	1,055	0,665	0,605 [0,613]**	1,824	1,752	
13. XII.	2130	132	—		[0,351]		—		
14. XII.	2250	300	—		[0,541]		—		
15. XII.	2230	375	1,257		0,814		1,544		
16. XII.	2200	430	1,291		0,692		1,865		
17. XII.	2230	310	1,081		0,608		1,777		täglich 2,5 g getrocknetes Fleisch *
18. XII.	2230	260	0,914		0,551		1,659		
19. XII.	2190	190	0,640		0,372		1,720		
20. XII.	2200	330	1,278	0,988	0,785	0,553	1,629	1,786	
21. XII.	2280	260	0,963		0,515		1,869		
22. XII.	2200	290	1,053		0,487		2,160		

* 2,5 g enthalten 0,49 g N.

** Der eckig geklammerte Wert 0,613 bezieht die eckig geklammerten N-Werte mit ein, während 0,605 diese eckig geklammerten N-Werte unberücksichtigt läßt.

Literatur.

1) *Tandler* und *Gross*, Arch. f. Entwicklungsmech. d. Org. **29** und **30**, — 2) *Pfister*, Arch. f. Gyn. 1898. — 3) *Burghardt*, Deutsch. med. Wochenschr. 1989, S. 37. — 4) *Loewy* und *Richter*, Klin. Wochenschr. Nr. 50; Du Bois Arch. 1899, Suppl. — 5) *Moebius*, Über die Wirkung der Kastration 1906. — 6) *Biedl*, Handb. d. Inn. Sekret. 1916, dort auch umfassendere Literaturangabe; Verhandl. d. Stoffwechselkongr. 1925. — 7) *Pächter*, zit. n. *Biedl*. — 8) *Guggenheimer*, Über Eunuchoidie, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **107**, 1912. — 9) *B. Zondek*, 1926. — 10) *Brugsch* und *Rothmann*, Med. Klin. 1926, Nr. 8, speziell Oophorin und Testiphorin. — 11) *Lüthje*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **48**, 50, 1903, zit. n. *Guggenheimer*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **107**, 1912. — 12) *Loewy* und *Richter*, Berl. Klin. Wochenschr. 1899, Nr. 50. — 13) *Thumin*, Therap. d. Gegenw. 1900. — 14) *Senator*, Berl. Klin. Wochenschrift 1897. — 15) *Neumann* und *Vos*, Monatsschr. f. Geb. u. Gyn. 1902. — 16) *Bogoslowski G. N.* und *W. G. Korentschewski*, zit. n. Jahrb. f. Physiol. 1921, S. 318; Phys. Ber. **16**, 363; die Originaltabellen waren trotz Bemühungen nicht erreichbar. — 17) *Wada*, diese Zeitschr. **174**, 400, 1926. — 18) *B. Zondek* und *S. Aschheim*, Klin. Wochenschr., 5. Jahrg., S. 400ff. u. 979. — 19) *Bickel* und *Kauffmann-Cosla*, Virchows Arch. **259**. — 20) *Bickel*, Vortrag Mai 1926; Tagung d. balneolog. Gesellsch. — 21) *Rubner*, Zeitschr. f. Biochem. 1881, S. 214ff. — 22) *Gomez*, diese Zeitschr. **167**, 424, 1926. — 23) *Bickel*, ebendaselbst **166**, 416, 1925. — 24) *Langstein-Gleinitz*, Die Kohlenstoff- und Stickstoffausscheidung durch den Harn beim Säugling, Jahrb. f. Kinderheilkde. **61**, 1905. — 25) *W. Raab*, Hormone und Stoffwechsel 1926.

Über die Biochemie des Filtrationsödems.

Von

Poul Iversen und Fusakichi Nakazawa.

(Mitteilung aus dem zoophysiologischen Laboratorium der Universität Kopenhagen und der medizinischen Abteilung B des Bispebjerg Spitals.)

(Eingegangen am 19. Oktober 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die Frage, wie ein Ödem entsteht, ist seit längerer Zeit Gegenstand eifriger Diskussion gewesen, eine Diskussion, die recht verständlich ist, da die Frage sowohl große theoretische wie praktische Bedeutung besitzt. Man rechnet im allgemeinen mit zwei Ödemformen, dem inter- und dem intrazellularen Ödem. Eine scharfe Sonderung zwischen diesen beiden Formen ist notwendig, da sie wahrscheinlich eine ganz verschiedene Pathogenese haben. *A. Krogh* (1) hat als erster in seinem Buche über Anatomie und Physiologie der Kapillaren diese pathogenetische Sonderung hervorgehoben.

Im nachstehenden werden wir uns bloß mit einer Form des interzellularen Ödems, — dem sogenannten Filtrationsödem — beschäftigen, welches man sich durch Filtration von Flüssigkeit aus dem Blute in den interzellularen Raum entstanden denkt, und dessen Eiweißmenge gering ist. Alle diejenigen, die sich mit dieser Frage beschäftigt haben, sind sich darüber im Klaren, daß die Ödemflüssigkeit aus dem Blute stammt, aber die Frage, die umstritten wird, ist, unter welchen Umständen eine solche Filtration vor sich geht. Teils dachte man sich, daß der hydrostatische Druck in der Blutbahn die Flüssigkeit hinauspreßt, teils daß die Kräfte außerhalb der Kapillarwand, im Gewebe, die Flüssigkeit zu sich saugten.

Damit die erste Ursache das Ödem bedingen soll, hat man sich bis vor einigen Jahren mit dem Gedanken beholfen, daß eine Kapillarbeschädigung vorliege, da man bei normalen Individuen durch Erhöhung des Blutdruckes kein Ödem hervorrufen konnte. Eine solche Kapillarbeschädigung findet *Cohnheim* (2) bei Entzündungsfällen (Entzündungsödeme), und eine Reihe anderer Forscher haben durch

Erklärung sowohl des cardialen wie des nephrogenen Ödems ihre Zuflucht zur Kapillarbeschädigung genommen.

Martin Fischer (3) trat eifrigst dafür ein, daß es die Gewebezellen seien, die die Flüssigkeit durch ihre sogenannte Quellungskraft aus dem Blute herausziehen, und er wies in einer Reihe interessanter Untersuchungen nach, daß Fibrin und Gelatine unter gewissen Umständen Wasser in sich aufnehmen und dies mit einer gewissen Kraft festhalten. Er meinte, daß die gleichen Verhältnisse sich unter Umständen im Gewebe geltend machten, wodurch ein Ödem entstehe. Dies könnte jedoch nicht interzellular, sondern nur intrazellular sein. *Eppinger* (4) hat auch mit einer Kraft außerhalb der Kapillare gerechnet, er meint, daß unter gewissen Umständen Eiweiß in das Gewebe hineindringt, und daß dies das Ödem verursache. Eine besondere Rolle für die Ödempathogenese mißt er einer mangelhaften Thyreoidinbildung zu.

Seit 1922 sind eine Reihe von Arbeiten erschienen, die darauf ausgehen, das Entstehen des Ödems durch pathologische Verschiebungen in den Kräften, die Wasser aus dem Blute bzw. festhalten und in die Kapillare ausfiltrieren, zu erklären, wogegen eine Kapillarbeschädigung als unnötig angesehen wird.

Die Kraft, die das Wasser ausfiltriert, ist der *hydrostatische Druck* (*Th*) in den Kapillaren, und diejenige, die es festhält, ist der *kolloid-osmotische Druck* (*Tc*), der von den Eiweißstoffen (Plasmakolloide) ausgeübt wird. Wenn der kolloid-osmotische Druck eine solch entscheidende Rolle spielt, liegt dies daran, daß die Kolloide normalerweise die Kapillaren nicht passieren können, was besagt, daß die Kräfte, mit welchen die Kolloide das Wasser binden, sich nur auf einer Seite der Kapillare befinden. Dies im Gegensatz zum kristalloid-osmotischen Druck, welcher in dieser Verbindung keine Rolle spielt, obzwar er etwa 150 mal so groß ist wie der kolloid-osmotische Druck. Die Kristalloide verteilen sich nämlich, praktisch genommen, gleich auf beiden Seiten der Kapillarwand, weshalb sie keine entscheidende Rolle bei der Druckdifferenz spielen, die vorhanden sein muß, damit das Wasser ausfiltriert wird.

Die Albuminstoffe des Blutes können in zwei Gruppen geteilt werden: *Serumglobulin* und *Serumalbumin*, wovon die Globuline die größten Moleküle besitzen, was begreiflich macht, daß eine Verschiebung zwischen diesen beiden Faktoren von entscheidender Bedeutung für *Tc* ist.

Eine solche Verschiebung in der Richtung gegen die Globuline wurde von verschiedenen Untersuchern bei gewissen Ödemfällen gefunden, so stellte *Epstein* (5) im Jahre 1922 fest, daß dies bei gewissen Formen nephrogener Ödeme der Fall ist. *Mc Lean* und *Wesselow* (6) und *Linder, Lundsgaard* und *v. Slyke* (7) haben später ähnliche Untersuchungen vorgenommen, ohne einen konstanten Zusammenhang zwischen dem Albumin- und Globulinverhältnis bei Ödemfällen finden zu können. Eine direkte Messung

von *Tc* wurde von ihnen nicht vorgenommen. *Stefan Ruszniak* (8) hat sich im Jahre 1924 auch mit diesem Verhältnis beschäftigt und es mit direkten Messungen von *Tc* kombiniert. Er findet eine vollständige Übereinstimmung zwischen der Herabsetzung der Albuminmenge und Steigerung der Fibrinogenmenge einerseits und Herabsetzung des kolloid-osmotischen Druckes andererseits. Auch *E. B. Mayrs* (9) und *Govaerts* (10) haben schöne Untersuchungen über direkte Messungen des kolloid-osmotischen Druckes bei Ödemfällen ausgeführt.

Von sämtlichen früher erwähnten Untersuchungen kann man sagen, daß sie nicht ganz klargelegt haben, daß das ganze Problem in erster Reihe vom *Verhältnis* zwischen dem hydrostatischen Druck in den Kapillaren und dem kolloid-osmotischen Druck des Blutes abhängig ist. Darauf ist zum ersten Male von *A. Krogh* in seinem Buche über die Anatomie und Physiologie der Kapillare hingewiesen worden, indem er als Beweis für seine Erklärung über das Entstehen des Ödems *Starlings* klassischen Versuch aus dem Jahre 1896 nannte, womit *Starling* nachgewiesen hat, daß im Blute eine Kraft vorhanden sein müsse, die imstande war, ein künstlich hervorgerufenes Ödem aufzusaugen. Diese Kraft, die den kolloid-osmotischen Druck des Blutes darstellt, hat *Starling* mit 450 mm Wasserdruck gemessen.

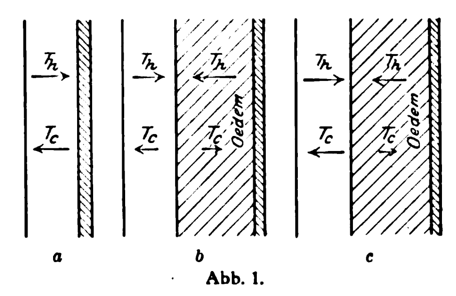


Abb. 1.

a Normal, $T_h < T_c$. *b* Nephrose, $T_h = \text{normal} > T_c$.
c Insuff. cordis, $T_h > T_c \lesseqgtr \text{normal}$.

Betrachten wir nun nebenstehende Zeichnung, die das Kapillar- und das subkutane Gewebe darstellt, können wir mit einigen Pfeilen, die nach verschiedenen Richtungen zeigen, die Kräfte angeben, die eine entscheidende Rolle für das Entstehen eines Filtrationsödems spielen. Normalerweise ist die Kraft, die vom Pfeile dargestellt wird, der vom subkutanen Gewebe wegzeigt, am größten (*Tc*), und unter solchen Verhältnissen passiert kein Wasser in die Subkutis.

Wir sehen deutlich, unter welchen Bedingungen eine solche Wasserpassage in Gang gesetzt werden kann: *Tc* kann um so viel vermindert werden, daß es niedriger als *Th* wird, oder *Th* kann um so viel vergrößert werden, daß es größer als das normale *Tc* wird, oder eine Kom-

bination beider Faktoren. Die Frage ist nun, ob wir bei den Ödemfällen, die uns von der Klinik her bekannt sind, Verhältnisse finden können, die dieser theoretischen Darstellung entsprechen.

Die zwei Hauptgruppen von Filtrationsödemen, die am meisten bekannt und umstritten sind, sind das nephrogene und das kardiale Ödem.

Nephrogenes Ödem.

A. Ödem bei großer chronischer Albuminurie.

In dem früher erwähnten Buche von *A. Krogh* über die Anatomie und Physiologie der Kapillaren ist ein Fall von Ödem bei Nephrose geschildert worden. Der Fall wurde von *Hagedorn, Rasmussen* und *Rehberg* untersucht. Sie fanden, daß ***Tc*** im Serum ungefähr 100 mm H_2O war, während er im Harn, welcher 2,8 % Eiweiß enthält, 240 mm betrug. Da der Eiweißgehalt im Serum 5 % war, sieht man leicht, daß ***Tc*** pro Gramm Eiweiß im Harne vier- bis fünfmal größer ist als im Blute. Sie führen dies an, weil sie dem eine große theoretische und praktische Bedeutung beimessen, indem sie meinen, daß die Ursache des niedrigen ***Tc*** des Blutes darin liege, daß die kleinen Proteinstoffmoleküle durch die Nieren ausfiltriert werden. Dadurch bekommt man eine Verschiebung im Serum in der Richtung gegen die großen Moleküle, was sowohl einen niedrigen ***Tc*** wie einen niedrigen *Tc pro Gramm Eiweiß* ergeben muß, was wir der Einfachheit halber *Trc* nennen werden, den reduzierten kolloid-osmotischen Druck. ***Th*** wurde im genannten Falle mit 150 mm bestimmt, also 50 mm größer als ***Tc***, was Filtration von Wasser durch die Kapillarwand bewirken muß, solange ***Th*** des Ödems nicht zu dem Werte erhöht wird, der größer ist als die Differenz zwischen ***Th*** und ***Tc*** im Blute [*Poul Iversen* (11)].

In *Tabelle I* sind acht Normalbestimmungen angeführt, die einen durchschnittlichen ***Tc*** von 362 und ***Trc*** von 47,4 zeigen. Diese Bestimmungen sind mit der Methode vorgenommen worden, die *A. Krogh* (12) angegeben hat. Wir wollen hier nicht näher auf diese Technik eingehen, die in einer Abhandlung in dieser Zeitschrift von *A. Krogh* und *F. Nakazawa* (13) ausführlich beschrieben wurde.

Tabelle I.

Nr.	% Eiweiß im Serum	*Tc*	*Trc*	[*Trc*]	Diff.
1	8,06	373	46	46	0
2	7,85	360	46	45	+ 1
3	7,20	342	48	44	+ 4
4	7,85	344	44	46	— 2
5	8,28	385	47	46	+ 1
6	7,42	401	54	44	+ 10
7	6,98	325	47	43	+ 4
8	7,62	359	47	45	+ 2
Durchschnitt:	7,56	362	47,4	44,9	+ 2.5

Wir haben vier Fälle mit chronischer großer Albuminurie untersucht, und das Resultat dieser Untersuchungen ist in *Tabelle II* zu finden. Der eine Fall war eine *chronische Nephrose*, wie man sie am häufigsten bei Eiweißmengen im Harn von 10 bis 20‰ und großen Ödemen sieht.

Der zweite Fall war eine *Amyloidose* mit großen Ödemen, wo die Eiweißmenge etwa 10‰ betrug.

Der dritte Fall war eine Quecksilbernephrose mit 9‰ Albumen und wechselnden Ödemen, am häufigsten recht große.

Schließlich war der vierte Fall ein Patient mit *chronischer Nephritis*. Sie hatte durch einige Jahre eine Albuminurie von 5 bis 7‰ gehabt, hatte aber selbst, wenn sie nicht bettlägerig war, keine manifeste Ödeme.

Man wird aus den Zahlen in der Tabelle ersehen, daß der kolloidosmotische Druck im Blute in den ersten drei Fällen 89, 80 bzw. 125 mm Wasserdruck, d. h. ein Drittel oder ein Viertel des normalen ist, wogegen man im vierten Falle 292 mm findet, was nur einer geringen Herabsetzung entspricht. Die Werte für *Trc* sind auch bedeutend niedriger als normal, indem sie 13, 20 bzw. 26 mm Wasserdruck in den ersten drei Fällen sind, wogegen man im letzten Falle 41 mm fand. Die niedrigen Werte, die derart erklärt werden müssen, daß eine Verschiebung gegen die großen Moleküle im Plasma stattgefunden hat, können nicht direkt mit dem Normalwert 47,4 (s. Tabelle I) verglichen werden, sondern müssen im Verhältnis zur gefundenen Eiweißmenge im Serum geschätzt werden, indem eine Hypalbuminose, durch Verdünnung jedenfalls außerhalb des Organismus entstanden, an sich eine Herabsetzung des *Trc* ergibt. Diese Herabsetzung geht innerhalb der Verdünnungen — mit welchen wir rechnen müssen — nach einer geraden Linie vor sich, wie dies in der früher erwähnten Arbeit von *A. Krogh* und *F. Nakazawa* gezeigt und erwähnt wurde.

In Tabelle II und in den folgenden Tabellen findet man nach der Kolonne mit den direkt gefundenen Werten von *Tc* drei Kolonnen. Die erste gibt den *Trc* an, der durch Berechnung aus dem gefundenen *Tc* festgestellt wurde; die zweite gibt den [*Trc*] an, welchen man aus dem normalen Serum erwarten konnte, der bis zum gegebenen Eiweißprozent im Serum verdünnt war, indem er nach der Kurve berechnet ist, die von *A. Krogh* und *F. Nakazawa* angegeben ist, und in der dritten Kolonne wird der Unterschied zwischen den zwei Werten von *Trc* mit Vorzeichen angegeben.

Tabelle II.

Chronische große Albuminurie.

Diagnose	Namen	% Eiweiß im		*Tc*	*Trc*	[*Trc*]	Diff.	Ödem
		Serum	Urin					
Nephrose . . .	*B. C.*	6,77	1,65	89 185	13 112	43	— 30	+++
Amyloidose . .	*E. A. B.*	3,94	1,0	80 76	20 76	35	— 15	++
Quecksilbernephrose . .	*T.*	4,81	0,9	175 85	26 96	37	— 11	++
Nephritis chron.	*A.*	7,2	0,5	292 50	41 100	44	— 3	—

In den drei ersten Fällen (Tabelle II) sieht man eine große Differenz, in der letzten eine ganz geringe, alle mit negativem Vorzeichen.

Im Harn findet man in allen vier Fällen einen bedeutend höheren *Trc* als den dem Serum entsprechenden. Die drei ersten Fälle entsprechen also

vollständig dem von *Hagedorn*, *Rasmussen* und *Rehberg* veröffentlichten, indem wir einen ***Tc*** finden, der so gering ist, daß man vermuten muß, daß ***Th*** einen Teil höher liegt, jedenfalls in bezug auf die dekliven Partien. Der vierte Fall, wo kein Ödem vorhanden war, zeigt nur geringe Herabsetzung von ***Tc*** und ***Trc***. ***Tc*** wird nicht unter den Wert von ***Th*** erniedrigt; bei diesem Patienten muß der Organismus imstande sein, regelmäßig den Substanzverlust zu decken, der durch die Nieren stattfindet.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß in allen Fällen, wo eine chronische Albuminurie gleichzeitig mit Ödem verbunden ist, ein so geringer ***Tc*** gefunden wird, daß dies allein imstande ist, die Bedingungen für ein Filtrationsödem zu bieten. Der gefundene niedrige ***Tc*** und ***Trc*** scheint als eine direkte Folge des großen Substanzverlustes durch die Nieren erklärt werden zu können.

B. Ödem bei akuter Albuminurie.

Hier haben wir auch vier Fälle untersucht. Bei den zwei ersten handelt es sich um Patienten mit drohender Eklampsie, die beide Ödeme haben; die zwei letzten Fälle sind Patienten mit Nephritis akuta. Der erste derselben hatte bei Untersuchung, die gleich nach Spitalsaufnahme vorgenommen wurde, Ödeme, wogegen bei dem zweiten, der leichte Ödeme vor Aufnahme hatte, zur Zeit der Untersuchung keine gefunden wurden.

Die Fälle sind in *Tabelle III* aufgeführt, wo man sieht, daß ***Tc*** in allen Fällen bedeutend herabgesetzt ist in bezug auf die drei ersten bis etwa zwei Drittel des normalen. Dementsprechend ist auch ***Trc*** herabgesetzt und liegt in allen drei Fällen etwas niedriger als [***Trc***]. Vergleichen wir nun den ersten Fall (Frau *A.*) in Tabelle III mit Fall 4 in Tabelle II, so sehen wir, daß die Werte für ***Tc*** und ***Trc*** einander decken, sie sind nur verhältnismäßig gering vermindert, und dementsprechend findet man kein Ödem in diesen Fällen.

Tabelle III.

Albuminuria acuta.

Name	% Eiweiß im		*Tc*	*Trc*	[*Trc*]	Diff.	Ödem	Diagnose
	Serum	Urin						
309 *B.*	6,34		238	38	41	—3	+	Drohende Eklampsie
		0,4	87	217				
1496 *B.*	6,34		228	36	41	—5	+	„ „
		2,0	198	99				
Frau *J.*	6,12		239	39	41	—2	+	Nephritis acuta
		0,6	64	106				
Frau *A.*	6,36		270	43	42	+1	—	„ „ Ödem vor der Spitalsaufnahme
		0,125	?	?				

Bei den drei anderen Patienten in Tabelle III liegen die Werte des ***Tc*** sehr nahe aneinander, indem sie nämlich 238, 228, 239 betragen.

Unter der Voraussetzung, daß es sich in diesen Fällen auch um Filtrationsödeme handelt, können wir also sagen, daß die Größe, die ***Tc*** haben muß, um ein Ödem zu bedingen, höchstens zwischen 240 bis 270 liegen darf. In gleicher Zone, jedoch höher als ***Tc***, muß ***Th*** liegen.

Die Untersuchung von *Trc* im Harn zeigte weit größere Werte als bei Serum, was darauf hindeutet, daß es auch die Ausfiltrierung der kleinen Moleküle durch die Nieren ist, die eine pathogenetische Bedeutung für das Ödem hat.

Zusammenfassung.

1. Wir haben die Beobachtungen *Hagedorns*, *Rasmussens* und *Rehbergs* bestätigt, daß man bei Nephrosepatienten mit Ödemen so geringe Werte des kolloid-osmotischen Druckes findet, daß dies allein die Filtrationsödeme erklären kann.

2. Auch bei akuter Albuminurie findet ein Fall des kolloid-osmotischen Druckes statt, der genügend groß ist, um das Entstehen des Ödems zu erklären.

3. Bei beiden Patientengruppen muß man vermuten, daß die Albuminurie von großer pathogenetischer Bedeutung ist.

4. Wo der hydrostatische Druck nicht pathologisch vermehrt ist, wird man bei außer Bett befindlichen Patienten Ödeme der unteren Extremitäten feststellen können, wenn der kolloid-osmotische Druck zwischen 240 bis 270 herabgesetzt ist.

Das kardiale Ödem.

Im vorhergehenden Abschnitt hatten wir es mit Fällen zu tun, wo *Tc* so niedrig war, daß dies allein einen Ödemzustand erklären konnte. Im nachfolgenden stellt sich das Verhältnis anders, denn selbst wenn die Herabsetzung des *Tc* bei Herzinsuffizienz so bedeutend sein kann, daß sie an sich genügend ist, ist dies doch nicht die Regel. Wir müssen damit rechnen, daß *Th* auf Grund der Stase vermehrt ist, und es wird in der Regel eine Kombination dieser beiden Faktoren sein, die das Ödem bedingt.

Direkte Messungen von *Th* in den Kapillaren bei Stase liegen nicht vor. *Moritz* (14) hat aber in einem Falle einer schweren Herzinsuffizienz einen Venendruck von 320 mm H_2O vorgefunden, was unzweifelhaft eine Vermehrung von *Th* in den Kapillaren bedeutet.

Dies ist uns zufolge der Messungen, die von *E. B. Carrier* und *P. B. Rehberg* (15) vorgenommen wurden, bekannt. Sie fanden, daß der hydrostatische Druck der Kapillaren (*Th*) und der Venendruck sowohl in bezug auf die oberen wie die unteren Extremitäten nicht aneinander liegen.

Wenn die Muskeln vollständig schlaff gehalten werden, so daß die Venenpumpe außer Funktion gesetzt ist, war der Druck, praktisch genommen, gleich dem hydrostatischen Druck, der der Stellung der gemessenen Kapillaren und der gemessenen Venen im Verhältnis zum Thorax entspricht.

Man gelangte doch nicht unter ein gewisses Miniumum, welches in bezug auf die oberen Extremitäten etwa 50 mm, und der unteren Extremitäten etwa 200 mm H_2O betrug, selbst wenn das untersuchte Gefäß bis zu einem Punkte gehoben wurde, der höher als der Thorax lag. Der Druck



ist nämlich teils von der Höhe, teils von der Friktion abhängig, und wenn nun die Venen dadurch, daß die Extremität gehoben wird, blutarm und enger werden, steigt die Friktion.

Die Arbeit der Venenpumpe geht derart vor sich, daß die Muskeln sich gleichartig und kräftig kontrahieren, indem das Blut dadurch gegen den Thorax hinaufgepumpt wird. Der Venendruck und dadurch auch der Kapillarendruck wird demnach geringer. Bei schwächlichen Patienten, besonders bei Patienten mit Kreislaufinsuffizienz, ist die Muskelarbeit weit geringer als normal, und da bei diesen Patienten außerdem eine venöse Stase besteht, ist es verständlich, daß die hydrostatischen Verhältnisse in den Kapillaren abnorm werden, *Th* wird größer als normal.

Als Folge davon braucht die Herabsetzung des *Tc* nur gering zu sein, damit sich das Ödem einstellen kann (vgl. Tabelle IV, Fall 2, *C. N.*).

Tabelle IV.

Insufficientia cordis.

Name	Datum	Eiweiß im Serum %	*Tc*	*Trc*	[*Trc*]	Diff.	Albuminurie	Ödem	Ödemdruck	Anmerkung
1. *F.O.W.*	5. XI.	4,81	173	36	38	— 2	+	+++	Crus dx. 64 mm H_2O	
	6. XII.	6,77	238	35	42	— 7	—	—	Femur dx. 50 mm H_2O	
2. *C. N.* . .	10. XI.	7,20	290	40	44	— 4	+	+	Crus dx. 60 mm H_2O	Bluttransfusion
	12. XI.	6,98	276	40	43	— 3	—	+	Femur dx. 85 mm H_2O	
	18. XI.	7,63	298	39	45	— 6	—	+		
	30. XI.	7,42	314	41	44	— 3	—	(+)		
	6. XII.	7,42	363	49	44	+ 5	—	(+)		
	13. XII.		340	42			+	+		
	31. XII.	7,63	296	39	45	— 6	++	+		
3. *N. F.* . .	17. XII.	6,77	274	40	42	— 2	+	+		
4. *R. M.*	29. X.	6,45	269	42	42	0	+	++	Crus sin. 36 mm H_2O	
	12. XI.	6,77	293	43	43	0	—	—	Pes sin.	
	20. XI.	6,55	272	42	42	0	+	(+)	36 mm H_2O	e. l.
5. *A.M.R.*	26. X.	6,55	269	41	42	— 1	+	+	Pes sin. 53 mm H_2O	
	23. XI.	7,20	240	47	44	+ 3	—	—		
6. *G.* . . .	26. X.	6,34	224	35	41	— 6	+	++++	Femur sin. 133 mm H_2O	
	9. XI.	5,47	215	39	39	0	+	++++		
	30. XI.	5,90	226	38	40	— 2	—	+++		

In *Tabelle IV* findet man sechs Fälle von Patienten mit kardialem Ödem, und man sieht, daß wir in den drei Fällen während der Behandlung normale oder nahezu normale Werte gleichzeitig mit dem Aufhören des Ödems und der Albuminurie gefunden haben. Es handelt sich um den Fall 4, *R. N.*, wo die Untersuchung am 12. November 293 ergab, ferner um den Fall 5, *A. M. R.*, wo die Untersuchung am 23. November 340 *Tc* zeigte; besonders deutlich ist der Fall 2, *C. N.* Hier handelt es sich um Hypertension und Herzinsuffizienz. Bei der ersten Unter-

suchung findet man in diesem Fall *Tc* 290 und *Trc* 40, nach Behandlung während einiger Zeit, wo die Ödeme nahezu ganz verschwunden und die Albuminurie aufhörte, findet man am 6. Dezember *Tc* 363 und *Trc* 49. Der Zustand verschlimmerte sich indessen wieder, und es entsteht wieder Albuminurie, die Ödeme nehmen zu, und am 21. Dezember findet man Werte, die den Werten bei der Aufnahme entsprechen, nämlich *Tc* 296 und *Trc* 39.

Die Frage ist nun die, was in diesem Falle die Ursache des niedrigen Tc war?

Die *Hypalbuminose*, die in den meisten Fällen vorhanden ist, kann einen Teil erklären, kann aber keine volle Erklärung des niedrigen *Trc* geben, indem dieser fast immer etwas niedriger als [*Trc*] liegt. Außerdem sieht man bei anderen Hypalbuminosen, z. B. derjenigen, die bei Blutungsanämie entsteht, und wovon drei Fälle in *Tabelle V* angeführt sind, keinen entsprechenden Fall des Trc, im Gegenteil liegt hier *Trc* etwas höher als [*Trc*].

Tabelle V.

Blutungsanämie.

Name	Datum	Hb %	Eiweiß im Serum %	*Tc*	*Trc*	[*Trc*]	Diff.	Diagnose
J. G.	28. X.	60	6,46	272	42	42	0	Melana
H. P. P.	15. XI.	45	5,90	250	42	40	+ 2	„
	6. XII.	40	5,68	264	47	40	+ 7	
	18. XII.		6,12	277	45	41	+ 4	
C. A.	1. XII.	35	6,34	277	44	41	+ 3	„
	6. XII.		6,55	318	49	42	+ 7	
	21. XII.	50						

Die für *Trc* bei Herzinsuffizienz gefundenen Werte deuten auf eine Verschiebung innerhalb der Kolloide des Blutes in der Richtung gegen die großen Moleküle, wogegen man bei Blutungsanämie mit einer Verschiebung gegen die kleinen Moleküle rechnen muß.

Kann man nun in bezug auf die Herzpatienten eine natürliche Erklärung einer Verschiebung im Serum gegen die großen Moleküle finden?

Wir wissen, daß Patienten mit Herzinsuffizienz am häufigsten, und zwar Monate hindurch, eine Albuminurie haben. Wenn man nun nachweisen kann, daß das Eiweiß, das bei solchen Patienten aus den Nieren ausgeschieden wird, aus kleinen, osmotisch sehr aktiven Molekülen besteht, hat man bewiesen, daß durch die Nieren ein Substanzverlust stattfindet, dessen Wirkung in gleicher Richtung wie bei Patienten mit nephrogenen Ödemen geht.



Diese Untersuchungen sind indessen nicht leicht auszuführen, da die Albuminurie, von welcher die Rede ist, verhältnismäßig gering ist und schnell verschwindet, wenn die Patienten zu Bett kommen. In zwei Fällen mit sicherer Stasealbuminurie fanden wir jedoch große Werte für ***Trc*** im Harn. In dem einen Falle fanden wir 133, in dem anderen 210, was beziehungsweise drei- und fünfmal so großen Werten entspricht als diejenigen, die man im Blute findet.

Man muß natürlich zugeben, daß der Substanzverlust, der durch die Nieren bei einem Herzpatienten vor sich geht, von einer geringen Größenordnung ist, kann aber nicht ausschließen, daß gleichzeitig, während dieser Substanzverlust vor sich geht, bei diesem Patienten eine mangelhafte Fähigkeit besteht, den Verlust zu ersetzen (Leberstase ?).

Tabelle VI.

Name	Datum	Eiweiß im Serum %	*Tc*	*Trc*	[*Trc*]	Diff.	Ödem	Anmerkung
J. O. W.	5. XI.	4,81	173	36	38	— 2	+++	+ Alb. *Southys* Kanülen
	10. XI.	4,38	170	39	37	+ 2	++	
	15. XI.	5,03	195	36	38	— 2	++	
	18. XI.	5,68	186	33	40	— 7	+	
	23. XI.	5,10	198	35	38	— 3	+	— Albuminurie
	30. XI.	6,55	241	37	42	— 5	+	— Albuminurie
	6. XII.	6,77	238	35	43	— 8	—	— Albuminurie
	21. XII.	5,90	238	40	40	0	+	— Albuminurie

In *Tabelle VI* ist ein Fall angeführt, der wiederholt untersucht wurde. Bei nahezu allen Untersuchungen wurde ***Trc*** bedeutend niedriger als normal gefunden und gleichzeitig niedriger als [***Trc***]. Obzwar man in diesem Falle eine bedeutende Steigerung der Eiweißmenge des Serums findet, und trotzdem die Albuminurie aufhört, findet man doch fortwährend die niedrigen Werte für ***Trc***, was derart gedeutet werden muß, daß es die kleinen Moleküle sind, die nicht schnell ersetzt werden können. Es handelt sich in diesem Falle um eine sehr schwere Herzinsuffizienz, die einen tödlichen Ausgang nahm.

Wir haben einen einzelnen Fall einer *orthostatischen Albuminurie* untersucht. ***Tc*** im Serum war 404 und ***Trc*** 53. Seine Albuminurie war zu gering, daß man *Tc* im Harne untersuchen konnte. Wenn man davon ausgeht, was wir anzunehmen meinen, daß auch er durch die Nieren kleine Eiweißmoleküle ausscheidet, ist er also imstande, nach und nach den Verlust zu ersetzen.

Falls die ganze Theorie über die Albuminurie als mitwirkende Ursache dieser Bildung von Ödemen, oder eher zur Herabsetzung von ***Tc*** im Serum richtig sein soll, muß man sich denken, daß es sich um eine mangelhafte Fähigkeit der Gefäße in den Glomeruli handelt, die Albuminstoffe bei Filtration zurückhalten. Je größer die Undichtigkeit in den Glomerulis ist, um so mehr Albumen wird passieren, dies will also sagen, daß ein gewisses Verhältnis zwischen dem Grade der Albuminurie und ***Trc*** im Harn vorhanden sein muß.

In Tabelle VII haben wir 15 verschiedene Untersuchungen von Harn (von 14 verschiedenen Patienten) schematisch aufgestellt, teils von Herzinsuffizienten, teils verschiedener anderer Nierenleiden.

Tabelle VII.

Nr. 1 und 2 bzw. r. und l. Unterharn.

Nr.	Eiweiß im Urin %	*Tc*	*Trc*	Diagnose
1	30	203	68	Nephrosis
2	27	161	60	„
3	20	198	99	Drohende Eklampsie
4	10	76	76	Amyloidosis
5	9	85	94	Quecksilbernephrosis
6	6	64	106	Nephritis acuta
7	5	33	66	Nephritis chron. Insuff. cordis
8	5	41	82	„ „ „ „
9	5	50	100	Nephritis chron.
10	4	53	133	Insuff. cordis
11	4	59	147	Nephritis acuta
12	4	87	217	Drohende Eklampsie
13	2	44	220	Nephritis acuta
14	1,25	35	280	Albuminuria
15	0,75	16	210	Insuff. cordis

Man sieht deutlich, daß, je geringer die Albuminurie, um so größer der *Trc*, was unserer Meinung nach derart gedeutet werden kann, daß, je mehr Eiweiß ausgeschieden wird, um so mehr auch große Moleküle die Nieren passieren.

Die Verhältnisse würden einfacher und die Reihe vermeintlich schöner sein, falls alle Glomeruli gleich stark angegriffen wären; aber der ungleiche Grad der Insuffizienz, mit welchem man sicher in den verschiedenen Glomerulis rechnen muß, bewirkt natürlicherweise, daß die Verhältnisse weiter kompliziert werden.

Es kommt uns vor, daß diese letzte Untersuchungsreihe recht unzweideutig beweist, daß es nicht weniger auf die Qualität als auf die Quantität des Eiweißes ankommt, der im Harn ausgeschieden wird.

Zusammenfassung.

1. Bei Patienten mit Herzödem ist nachgewiesen worden, daß man stets eine Herabsetzung des kolloid-osmotischen Druckes findet, sie mag nun gering oder sehr groß sein.

2. Es ist wahrscheinlich gemacht, daß Stasenalbuminurie bei Herzinsuffizienz eine große Rolle für die Herabsetzung des kolloid-osmotischen Druckes spielt.

3. Die Herabsetzung des kolloid-osmotischen Druckes kann so groß sein, daß sie an sich genügend ist, um die Entstehung des Ödems zu erklären. In allen Fällen aber spielt die Vermehrung des hydrostatischen Druckes, die von schlechtem Kreislauf herstammt, eine bedeutende Rolle und ist in einigen Fällen notwendig.

4. Die Herabsetzung des reduzierten kolloid-osmotischen Druckes kann nicht durch Hydrämie allein erklärt werden.



5. Der reduzierte kolloid-osmotische Druck im Harn ist am größten, wenn die Albuminurie am geringsten ist, welchem Umstande man eine Bedeutung für die Pathogenese des Ödems beilegen muß.

Der kolloid-osmotische Druck in Transsudaten und Exsudaten.

Die bisher vorgelegten Untersuchungen führten uns ganz natürlich zu den Untersuchungen über den kolloid-osmotischen Druck in Flüssigkeiten, deren Eiweißgehalt auch dadurch entstanden sein kann, daß die Kapillaren undicht wurden und die Passage von Eiweißmolekülen zuließen. Einem Vergleich dieser Untersuchungen mit denen an Harn meinten wir deshalb großes Interesse beilegen zu müssen. Die Frage, die in erster Reihe Interesse bot, war: *Findet man auch in diesen Flüssigkeiten einen Trc, der höher als Trc im Serum ist?*

Wir haben vier Pleuraflüssigkeiten untersucht, *Tabelle VIII*; drei stammen von Patienten mit tuberkulöser Pleuritis, die vierte von einem Patienten mit Tumor pulmonis (sonst eine Ascitesflüssigkeit eines Patienten mit Ascites tuberculosa).

Tabelle VIII.

Exsudaten.

Namen	Datum	% Eiweiß im		*Tc*	*Trc*	[*Trc*]	Diff.	Diagnose
		Serum	Exsud.					
J. P.	9. XI.		4,89	228	47	38	+ 9	Pleuritis exs. tub.
	12. XI.	7,65		348	46	45		
E. P.	25. XI.		4,27	184	39	36	+ 3	" " "
	6. XII.	7,42		337	45	44		
Chr. P.	20. XII.		2,62	116	44	31	+ 13	Tumor pulmonis
	20. XII.	7,2		331	46	44		
11 (101)	15. XII.	—	5,3 —	246	46	39	+ 7	Pleuritis exs. tub.
	15. XI.		2,83	118	42	31	+ 11	Ascites tub.
	17. XI.	6,98		309	44	43		

Bei allen fünf Fällen sehen wir, daß das Exsudat einen ***Trc*** hat, der bedeutend über [***Trc***] liegt, was besagen will, daß ein Teil der größten Moleküle im Blute zurückgehalten und nur die kleineren ausfiltriert werden.

Schließlich haben wir Gelegenheit gehabt, ***Tc*** in zwei Ödemflüssigkeiten und einer Ascitesflüssigkeit von einem Patienten mit Lebercirrhose (Transsudat) zu untersuchen. Die Zahlen waren hier ganz klein und sind in *Tabelle IX* angeführt. Es soll hier nur bemerkt werden, daß es sich in diesen Fällen anscheinend nicht um Ausfiltrierung von ganz kleinen Molekülen handelt. Man findet hier also kein Verhältnis, das mit demjenigen identisch ist, welches wir in bezug auf Harneiweiß gefunden haben.

Tabelle IX.

Transsudate und Ödemflüssigkeit.

% Eiweiß im		Tc	Trc
Ödem	Ascites		
0,6		17	30
0,77		23	30
	0,77	27	36

Die *Zusammenfassung* über die Untersuchungen der nephrogenen und kardialen Ödeme findet man S. 313 und 317.

Literatur.

1) *A. Krogh*, Anatomie und Physiologie der Kapillaren. J. Springer, 1924 (auf englisch 1922). — 2) *Cohnheim*, Allgemeine Pathologie. — 3) *Martin Fischer*, Das Ödem. Dresden 1910. — 4) *Eppinger*, Zur Pathologie und Therapie des menschlichen Ödems. Berlin 1917. — 5) *Epstein*, Amer. Journ. med. Soc. **167**, 1922. — 6) *MacLean* und *Wesselow*, Quart. Journ. Med. **12**, 337, 1918/19, zit. n. *Mayrs*. — 7) *Linder*, *Lundsgaard* und *v. Slyke*, Journ. exper. Med. **39**, 887, 1924. — 8) *Stefan Rusznyak*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **4/6**, 532, 1924. — 9) *E. B. Mayrs*, Quart. Journ. Med. **19**, 273, 1926. — 10) *Gowaerts*, Bull. acad. Roy. med. Belg. **4**, 161, 1924. — 11) *Poul Iversen*, Oedemteorie og Oedembehandling, Ugeskrift f. Læger **8**, 43, 1927. — 12) l. c. — 13) *A. Krogh* und *F. Nakazawa*, Biochem. Zeitschr. **188**, 241, 1927. — 14) *Moritz*, zit. nach *Hoffmann*, Lehrbuch der funktionellen Diagnostik und Therapie der Erkrankungen des Herzens und der Gefäße. — 15) *E. B. Carrier* und *B. B. Rehberg*, Scand. Arch. f. Phys. 1922.

Die Rolle des Pyocyanins im Stoffwechsel von Pseudomonas pyocyanea.

Von

A. A. Stheeman.

(Aus dem Laboratorium für Mikrobiologie der Technischen Hochschule zu Delft, Holland.)

(Eingegangen am 19. Oktober 1927.)

I. Über die Bedeutung der Bakterienpigmente im allgemeinen.

Der erste, der sich bemüht hat, eine rationelle, sei es auch eine vorläufige, Einteilung der farbstoffbildenden Bakterien vorzunehmen, war *Beijerinck* im Jahre 1891[1].

Beijerinck unterschied die folgenden Bakteriengruppen:

a) die chromophoren,
b) die chromoparen,
c) die parachromophoren.

Zu a) In den chromophoren Bakterien ist der Farbstoff ein integrierender Teil der Mikrobenzelle. Er ist darin gebunden, wie das Chlorophyll in den Chromatophoren der höheren Pflanzen oder wie das Hämoglobin in den roten Blutkörperchen.

Als Beispiel dieser Gruppe nennt *Beijerinck* die *Schwefel-Purpur-Bakterien Winogradskys*.

Zu dieser Gruppe rechnet *Beijerinck* auch die grünen, roten, gelben und braunen Bakterien, die die Gelatine nicht verflüssigen. *Beijerinck* ist der Meinung, daß in allen diesen Fällen den Farbstoffen eine bestimmte biologische Bedeutung, obschon meistens noch unbekannter Natur, zugeschrieben werden muß.

Zu b) Die zweite Gruppe, die der chromoparen Bakterien, von *Beijerinck* die eigentlichen Pigmentbakterien genannt, trägt das Hauptmerkmal, daß im Anfang die lebendige Mikrobenzelle ungefärbt ist, und *Beijerinck* fügt hinzu: „La matière colorante est séparée comme telle ou comme matière chromogène incolore et on ne doit y voir qu'un produit d'excrétion sans utilité pour l'organisme".

Im Einklang hiermit werden von den chromoparen Mikrobenarten ebenso leicht, oder bisweilen leichter, ungefärbte Kulturen als gefärbte erhalten.

[1] *Beijerinck*, Bot.-Ztg., 49. Jahrg., S. 705 usw., 1891; Arch. Néerlandaises d. Sciences exactes et naturelles, Tome **25**, 227, 1891; Verzamelde Geschriften, Delft 1921, Deel II, S. 332.



Als Beispiele dieser Gruppe gibt *Beijerinck* *B. prodigiosus*, *B. cyanogenes* und *B. pyocyaneus*.

Zu c) Die dritte Gruppe ist diejenige der parachromophoren Bakterien. Bei diesen ist der Farbstoff augenscheinlich ein Stoffwechselprodukt, daß aber in der Zelle gebunden bleibt, wie bei den wahren chromophoren Bakterien, und das also nicht nach außen diffundiert. Der Unterschied zur ersten Gruppe ist, daß die chromophoren Bakterien immer gefärbte Kolonien bilden, während die parachromophoren nur unter sehr bestimmten Umständen zu gefärbten Kolonien auswachsen. Als Beispiele nennt *Beijerinck* *B. violaceus* und *B. janthinus*.

Diese Einteilung gibt keinen Aufschluß über die Entstehungsweise des Farbstoffs. Nur von einer Mikrobenart glaubt *Beijerinck* behaupten zu können, daß der Farbstoff ein von den Bakterien gebildetes Oxydationsprodukt ist. Die Ansicht, daß bestimmte Bakterienfarbstoffe als Oxydationsprodukte aufzufassen sind, finden wir auch bei *Fuhrmann*[1]. Er schreibt nämlich: „Wir dürfen mit Recht annehmen, daß zahlreiche Farbstoffe als Leucoverbindung aus der Zelle ausgeschieden werden und erst dann zur gefärbten Verbindung oxydiert werden“.

Lafar[2] sagt: „Alle Bakterienfarbstoffe haben eigenartige Beziehungen zum Sauerstoff“, und *Marshall*[3] behauptet: „Oxygen is also necessary for the chromogenesis of many bacteria“. Dies alles betrifft nur die Entstehungsweise des Pigments. Über den Zweck des Farbstoffs der Bakterien äußern sich *Friedberger* und *Pfeiffer*[4], wenn sie sagen: „Alle echten Bakterien sind aber mit wenigen, noch nicht ganz sichergestellten Ausnahmen chromopar, und bei ihnen kommen dem Farbstoff keine wichtigen Lebensfunktionen zu“. Und *Marshall*[5] sagt: „It is not known that the pigment is of any material advantage to Bacteria. All experiments concerning the purpose of pigmentformation by microorganisms have been without result“. Zitieren wir zum Schluß noch *Fuhrmann*[6] nach der neuesten Auflage seines Lehrbuches. Dieser Autor sagt: „Die Vertreter der zweiten Gruppe der farbstoffbildenden Mikroben, die ‚chromoparen Bakterien‘, bilden Farbstoffe, die für das Leben der Zelle unwesentlich sind und einfach als nebensächliche Exkretstoffe aus der Zelle ausgeschieden werden. Allen neueren Forschungen entsprechend, müssen wir hierher *alle* farbstoffbildenden Bakterien, mit Ausnahme der Purpurbakterien, rechnen, da mit Ausnahme des Farbstoffs der letzteren alle Bakterienfarbstoffe keinen irgendwie gearteten Einfluß auf das Leben der sie erzeugenden Zelle auszuüben vermögen. Sie sind rein zufällige Bildungen der Zelle, wie so manche andere“.

Ich will jetzt zeigen, daß diese oben zitierten Ansichten der Autoren der betreffenden Lehrbücher in flagrantem Widerspruch sind mit den Resultaten älterer und neuerer Forschungen.

---

[1] *Fuhrmann*, Einführung in die Grundlagen der technischen Mykologie, 2. Aufl., S. 110. Jena 1926.

[2] *Lafar*, Handb. d. techn. Mykologie **1**, 289, Jena 1904 bis 1907.

[3] *Marshall*, Microbiology. Second Ed., London 1921, S. 247.

[4] *Friedberger* und *Pfeiffer*, Lehrb. d. Mikrobiologie **2**, 55, 1919.

[5] *Marshall*, Microbiology. Second Ed., London 1921, S. 175.

[6] *Fuhrmann*, Einführung in die Grundlagen der technischen Mykologie, 2. Aufl., S. 110. Derselbe Passus, buchstäblich gleich, auch in der 1. Aufl., S. 98. Jena 1913.

Beijerinck hat schon in die erste Gruppe (die der chromophoren Bakterien) neben den Purpurbakterien noch eine Anzahl gefärbter Bakterien eingereiht. Auch dem Pigment dieser Mikroben schreibt er auf Grund des konstanten Vorkommens in der Zelle eine Bedeutung zu, die aber noch unbekannter Natur ist. Tatsächlich ist nun von *Pfeffer*[1] und *Ewart*[2], etwa 5 Jahre nachdem *Beijerinck* obenstehende Einteilung gegeben hatte, die Entdeckung gemacht worden, daß gewissen Pigmentbakterien die Fähigkeit zukommt, den Luftsauerstoff in einer lockeren Bindung zu speichern. *Shibata*[3] hat die Untersuchung dieses Gegenstandes weiter in Angriff genommen und in sehr eingehenden, schönen „Untersuchungen über lockere Bindung von Sauerstoff in gewissen farbstoffbildenden Bakterien und Pilzen" mittels der *Engelmann*schen Methode nachgewiesen, daß viele gefärbte Bakterien in einer Atmosphäre verschiedener Gase Sauerstoff abgeben. Er zeigte auch, daß ungefärbte Kulturen diese Eigenschaft nicht besitzen, aber daß die getöteten Kulturen der gefärbten Bakterien ebenso wie das Pigment selber, die Sauerstoffabgabe wohl zeigen. Weiter konnte nachgewiesen werden, daß CO, Äthylen und Acetylen den Sauerstoff in diesen Pigmenten verdrängen können, und daß in dieser Pigment-CO-Bindung das CO bzw. Äthylen oder Acetylen wieder durch Sauerstoff vertrieben werden kann. In seiner Zusammenfassung kommt *Shibata* zu folgenden Schlüssen: Die von vielen Bakterien erzeugten lipochromen Farbstoffe sind als das O_2-bindende Agens anzusehen. „Der aufgespeicherte Sauerstoff wird allmählich frei gemacht, sobald die O_2-Spannung in der Umgebung auf Null sinkt. Die biologische Bedeutung der O_2-Speicherung liegt offenbar darin, daß die betreffenden Organismen, falls sie vorübergehend einen völligen O_2-Mangel erleiden, diesen O_2-Vorrat veratmen und dadurch die Notlage überstehen können. Es kommt noch dazu, daß diese Organismen eine rege Atmungstätigkeit selbst bei sehr niedriger O_2-Spannung unterhalten können, indem die Farbstoffe O_2-kondensierend, d. h. den O_2-Druck regulierend wirken. Die untersuchten Bakterienfarbstoffe fungieren nicht als O_2-Überträger, sondern nur als O_2-Speicher und bilden somit ein Analogon zu dem tierischen Blute."

Shibata fand diese Eigenschaften der Pigmente in Versuchen sowohl mit Mikroben der chromophoren und parachromophoren als der chromoparen Gruppe.

Wir kommen also zu dem Schluß, daß außer den Purpurbakterien, in welchen das Pigment die Kohlensäureassimilation katalysiert, es noch andere Mikroben gibt, wofür das Pigment auch eine wichtige Funktion beim Lebens- und Stoffwechselprozeß erfüllt.

Über das Pigment des *Ps. pyocyanea* ist schon viel geschrieben worden, das aber keine Auskunft über die Art und die Bedeutung des Pigmentes gebracht hat. Es gibt aber zwei Ausnahmen, nämlich die Arbeit von *Christomanos*[4] und die von *Furlani*[5].

---

[1] *Pfeffer*, Ber. d. kgl. sächs. Ges. d. Wiss **48**, 379. Leipzig 1896.
[2] *Ewart*, Journ. Linn. Soc. Bot. **33**, 123, 1897.
[3] *Shibata*, Jahrb. f. wiss. Bot. **51**, 179, 1912.
[4] *Christomanos*, Zeitschr. f. Hygiene **36**, 258, 1901.
[5] *Furlani*, Sitzungsber. d. Math.-naturwiss. Klasse Wien **128**, I, 25, 1919.

Der erste hat beobachtet, daß das blaue Pyocyanin ein Oxydationsprodukt ist; *Christomanos* stellte nämlich fest, daß das Pyocyanin durch Autoxydation aus einer Leukoverbindung hervorgeht.

Über die biologische Bedeutung des Pigments hat *Furlani* geschrieben. Er kommt zu dem Schluß, daß dieses Pigment nicht betrachtet werden muß als ein bedeutungsloses Ausscheidungsprodukt des Bakteriums (wie die allgemeine Ansicht ist), aber daß dem Pyocyanin eine wichtige Bedeutung für den Stoffwechsel des *Ps. pyocyanea* zugeschrieben werden muß. Dies ist zweifellos richtig, aber die Folgerung *Furlanis*, daß das Pyocyanin ein „Sauerstoffvehikel" sein würde, muß ich bestreiten, denn nach meiner Meinung kommt *Furlani* zu diesem Schlusse infolge unrichtiger Deutung seiner Versuche. Ich werde hier diesen Gegenstand etwas näher besprechen.

Furlani[1] sagt: „Die Reduktion des Cyanins (d. h. die Überführung in die Leukobase) ist in den Bouillonkulturen ein Lebensvorgang zur Gewinnung von Atmungssauerstoff. Das Pigment ist hier ein Sauerstoffvehikel zum Transport nach tieferen Flüssigkeitsschichten, es verhält sich also wie die Atmungspigmente". Weiter fügt er die überraschende Behauptung hinzu, daß diese Bedeutung dem Pigmente nur in Bouillonkulturen zukommt; er sagt nämlich: „Im Peptonwasser ist das Cyanin ein bedeutungsloses Ausscheidungsprodukt." Ich werde jetzt mitteilen, aus welchen Gründen *Furlani* behauptet, daß das Pyocyanin „ein Sauerstoffvehikel" ist. *Furlani* beobachtete, daß bei Luftzutritt gewachsene grüne Bouillonkulturen bei Luftabschluß anfangen, zu erbleichen, bis dieselbe im ganzen eine gelbgrün fluoreszierende Farbe angenommen haben. „Durch Einleiten von Sauerstoff wird die grüne Farbe wieder regeneriert." Jetzt fügt *Furlani* hinzu: „Es ist dies ein Beweis dafür, daß in den Bouillonkulturen der vom Pigment gebundene Sauerstoff nach Entzug des Luftsauerstoffs aufgebraucht worden ist, und daß dem vom Pigment locker gebundenen Sauerstoff die gleiche Verwendung zukommt wie dem Luftsauerstoff." Richtig ist allerdings die Beobachtung, daß die Farbe des Pyocyanins von Sauerstoff regeneriert wird, aber diese Regeneration der Farbe ist doch noch kein Beweis dafür, daß das Pigment in diesem gefärbten Zustande locker gebundenen Sauerstoff enthält. Die Möglichkeit einer Leukofarbstoff-O_2-Bindung ist denkbar, aber der Beweis einer solchen Bindung ist durch obenstehende Beobachtung nicht geliefert worden.

Eine Bindung von Sauerstoff an dem Pigment des *B. prodigiosus* und des *Ps. pyocyanea* oder an den Bakterien selber, ist von *Ewart* und auch von *Shibata*[2] infolge genauer Untersuchung abgelehnt worden.

[1] *Furlani*, l. c.
[2] *Shibata*, Jahrb. f. wiss. Bot. **51**, 212, 1912.

Furlani kennt diese Versuche, er behauptet aber, daß nicht aller „locker" gebundener Sauerstoff abgegeben wird, wenn die O_2-Spannung auf Null sinkt, aber daß diese Abgabe des Sauerstoffs bisweilen nur durch Reduktionsmittel zu erzielen ist. Er stützt diese Auffassung auf die Untersuchungen von *Ray-Lankaster*, *Griffith* und *von Krukenberg*, die gezeigt haben wollen, daß es Atmungspigmente gibt, die nicht durch molekularen Wasserstoff reduziert werden können. Nach *Furlani* kommt ein Pigment wohl dann als Sauerstoffüberträger in Betracht, „wenn es durch einen lebenden Organismus zur Base reduziert, neuerlich befähigt ist, Sauerstoff zu binden, und sich dieser Wechsel von Oxydation und Reduktion durch längere Zeit wiederholen läßt". Hier zieht nach meiner Meinung *Furlani* einen Fehlschluß, da wir durch Untersuchungen *Wielands* wissen, daß nicht jeder Farbstoff (Pigment), der durch einen Organismus reduziert werden kann und durch den Sauerstoff regeneriert wird, ein Sauerstoffüberträger zu sein braucht.

Ich werde in meinen Versuchen zeigen, daß es genügt, dem Pyocyanin die Funktion eines Wasserstoffakzeptors zuzuschreiben, ohne daß es nötig ist, darin gerade die Anwesenheit „lockeren Sauerstoffs" anzunehmen.

II. Beobachtungen über das Verhalten des Pyocyanins in Kulturen von Pseudomonas pyocyanea.

Zu der Meinung, daß dem Farbstoff „Pyocyanin" eine Bedeutung im Stoffwechselprosse des *Ps. pyocyanea* zugeschrieben werden muß, kam ich durch die folgenden Beobachtungen[1].

a) In einem großen Erlenmeyerkolben (Inhalt 1 Liter) mit sterilem Leitungswasser und 10% sterilem Blutfibrin[2] war 1 ccm einer Reinkultur des *Ps. pyocyanea* in Fleischwasser gebracht worden. Der Kolben wurde bei 37° C im Brutschrank belassen; nach einiger Zeit war üppiges Wachtum des Bakteriums wahrzunehmen. Wurde nun der ganze Inhalt geschüttelt, so bekam die anfangs gelb-graue Flüssigkeit eine dunkelblaue Farbe. Ließ man den Kolben wieder ruhig stehen, so wurde innerhalb 10 bis 15 Minuten die 10 cm hohe Schicht der Kulturflüssigkeit wieder entfärbt bis auf eine ganz dünne Schicht an der Oberfläche. Die Entfärbung fing unten im Kolben an und ging immer weiter nach oben. Beim Schütteln an der Luft trat wieder schnell Blaufärbung ein. Man konnte dieses Spiel unzählige Male wiederholen.

---

[1] Daß auch *Furlani* dem Pyocyanin eine Bedeutung beim Stoffwechsel zugeschrieben hatte, war mir zu der Zeit als ich meine Versuche anstellte noch unbekannt.

[2] Nebst 0,2% K_2HPO_4 und 0,5% Glucose.



Auch Kulturen in Fleischwasser, Milch, Peptonlösung zeigten genau dasselbe Verhalten, allein war die Blaufärbung nicht so schön wie in der Fibrinkultur.

Weiter beobachtete ich, daß ältere Kulturen das Pyocyanin nur langsam entfärbten, und daß abgetötete Kulturen die Reduktion (Entfärbung) gar nicht mehr ausführen konnten.

Wurde eine *Ps. pyocyanea*-Kultur, nachdem gute Farbstoffbildung stattgefunden hatte, in eine luftdicht geschlossene Flasche (die ganz gefüllt wird) übertragen, so trat eine totale Entfärbung des Inhalts auf, eine blaue Oberflächenschicht war dann nicht mehr zu beobachten.

Hieraus kann man nun folgendes schließen:

1. Der blaue Farbstoff Pyocyanin entsteht durch den Luftsauerstoff aus einer Leukoverbindung.

2. Die Leukoverbindung entsteht während des Dissimilationsprozesses von *Ps. pyocyanea*.

b) Die folgende Beobachtung macht es nun aber unwahrscheinlich, daß das Pyocyanin durch eine einfache Sauerstoffentziehung aus der Leukobase hervorgeht.

Die wässerige Lösung des isolierten Farbstoffes (Pyocyanin) wurde im Becherglase in einen Vakuumexsikkator gestellt. Die Luft wurde mittels einer Hochvakuumpumpe weggenommen und die letzten Spuren Sauerstoff mit alkalischer Pyrogallollösung entfernt. Auch nach längere Zeit währendem Stehen war keine Entfärbung der Pyocyaninlösung zu beobachten.

c) Die Entfärbung einer Pyocyaninlösung konnte jedoch erreicht werden durch Reduktion mittels $(NH_4)_2S$ oder $Na_2S_2O_4$ bei schwach alkalischer Reaktion und durch Reduktion mit Wasserstoff in statu nascendi. Auch durch Erwärmen mit schwach alkalischer Glucoselösung ist Entfärbung des Pigmentes zu erzielen.

Wir können also den Schluß ziehen, daß die Entfärbung des Pyocyanins ein Reduktionsprozeß ist.

Fassen wir wieder diese Beobachtungen zusammen, dann sehen wir:

1. Eine Kultur von *Ps. pyocyanea* kann das Pyocyanin während seines Stoffwechselprozesses entfärben.

2. Einfache Sauerstoffentziehung hat keine Entfärbung einer Pyocyaninlösung zur Folge.

3. Die Zufuhr von Sauerstoff kann die ungefärbte Verbindung wieder in das blaue Pyocyanin zurückführen.



4. Die Entfärbung des Pyocyanins in Lösung kann auch durch Reduktion erzielt werden.

Wahrscheinlich ist also die Entfärbung des Pyocyanins in einer Kultur von *Ps. pyocyanea* das Resultat eines Reduktionsprozesses, das durch die Mikrobe oder durch seine Stoffwechselprodukte zustande gebracht wird.

Jetzt kann man sich zwei Möglichkeiten denken:

I. Das blaue Pyocyanin enthält mehr Sauerstoff als das ungefärbte Pigment, und dieser Sauerstoff wird ihm durch das Bakterium während seines Dissimilationsprozesses wieder genommen.

II. Oder das ungefärbte Pyocyanin enthält mehr labil gebundenen Wasserstoff als das blaue Pyocyanin, und dieser Wasserstoff wird durch den Luftsauerstoff oxydiert.

Im letzten Falle würde das Pigment aus dazu fähigen Verbindungen Wasserstoff aufnehmen und diesen wieder an Luftsauerstoff abgeben. Das Pigment würde also ein Wasserstoffakzeptor im Sinne *Wielands* und *Thunbergs* sein.

Wir können dann den Entfärbungsprozeß wie folgt deuten:

$$\text{Pyocyanin} + \text{Wasserstoff} \rightarrow \text{Pyocyanin-Wasserstoff}$$

und

$$\text{Pyocyanin-Wasserstoff} + \text{Sauerstoff} \rightarrow \text{Pyocyanin} + H_2O_2.$$

Wir werden in Abschnitt IV zeigen, daß diese Auffassung aller Wahrscheinlichkeit nach die richtige ist.

III. Bildung und Isolierung des Pyocyanins.

Für die Versuche, nachzuweisen, daß das Pyocyanin, wenn es in die Leukobase übergeführt wird, wirklich als Wasserstoffakzeptor fungiert, brauchte ich größere Mengen dieses Farbstoffes. Um diese zu bekommen, züchtete ich anfangs *Ps. pyocyanea* in Fleischwasser in einem Erlenmeyerkolben. Die Ausbeute an Pyocyanin war aber sehr gering. Ich beobachtete aber bald, daß diese Ausbeute größer wurde, wenn die Schichten dünner waren, also dem Luftsauerstoff besserer Zutritt in allen Teilen des Kulturmediums möglich war.

Offenbar bildet *Ps. pyocyanea* in den Fällen, in welchen ihr reichlich Sauerstoff als Wasserstoffakzeptor zur Verfügung steht, eine größere Menge Pyocyanin, was man in der Weise deuten konnte, daß neben Reservestoffen, welche als Dissimilationssubstrat dienen können,

auch Reserve-Wasserstoffakzeptoren in der Zelle gelagert werden. Auf Grund dieser Überlegung versuchte ich, diese stärkere Bildung des Pigmentes auch in höheren Flüssigkeitsschichten zu bekommen, und versuchte dies dadurch zu erreichen, daß die Bakterien in allen Teilen des Kulturmediums einen Wasserstoffakzeptor zur Verfügung hatten, welcher den Luftsauerstoff vertreten konnte. In diesem Falle könnte man erwarten, daß das Pyocyanin fortwährend und sofort regeneriert werden würde und dadurch eine gute Bildung des Farbstoffes gesichert sein würde. Diesen Wasserstoffakzeptor fand ich im Kaliumnitrat. Wurden kleine Mengen dieses Stoffes der Kulturflüssigkeit zugefügt, dann war das Medium dauernd blau gefärbt und ich erhielt gute Ausbeuten an Pyocyanin in bequemer Weise. Ich benutzte bei diesen Versuchen das folgende Kulturmedium:

Leitungswasser, 1 % Pepton-*Witte*, 0,2 % K_2HPO_4, 0,2 % KNO_3, 0,01 % $MgSO_4$, 0,2 % NaCl.

Ich benutzte Erlenmeyerkolben (1 Liter Inhalt); jeder mit etwa 200 ccm Flüssigkeit, diese wurden sterilisiert und geimpft mit 1 ccm einer Kultur von *Ps. pyocyanea* in Fleischwasser. Der Kolben wurde 2 Tage bei 36 bis 37° C gestellt, nach welcher Zeit der Inhalt dunkelblau geworden war. Die Kulturflüssigkeit wurde dann einmal im Scheidetrichter mit der gleichen Menge Chloroform ausgeschüttelt. Die gesammelten Chloroformmengen wurden ausgeschüttelt mit einer geringen Menge sehr schwach angesäuerten Wassers, das blaue Pyocyanin geht dann mit violett-roter Farbe als Salz in das Wasser über, das Chloroform wurde abgelassen, das Wasser wieder alkalisch gemacht und jetzt die wieder blaue Pyocyaninbase abermals in Chloroform aufgenommen. Dies wurde dreimal wiederholt und die letzte rosagefärbte wässerige Lösung des Pyocyaninsalzes bei etwa 15° C im *Faust-Heim*schen Apparat bis zur Trockne eingeengt. Es restierten dunkelrot-violette Nadeln. In dieser Weise konnte in 3 Tagen aus 1 Liter Kulturflüssigkeit 300 bis 350 mg des Pyocyaninsalzes isoliert werden. Läßt man die geimpfte Kulturflüssigkeit länger als 2 bis 3 Tage bei 37°, dann kann Braun- bis Schwarzfärbung des Kulturmediums auftreten und das Pyocyanin ist verloren gegangen, wahrscheinlich entsteht dann ein Oxydationsprodukt des Pigments[1].

Wie schön ein dazu geeigneter *Ps. pyocyanea-Stamm* auf die Zugabe von Kaliumnitrat zu dem Kulturmedium mit intensiverer Farbstoffbildung reagieren kann, geht aus nachstehender Tabelle hervor.

[1] Vergleiche hierfür: *Furlani*, Sitzunsgber. d. Math.-naturwiss. Klasse Wien **128**, 29 und 30, 1919.



Tabelle A.

Kulturflüssigkeit: Leitungswasser. 1 % Pepton-*Witte*. 0,1 % K_2HPO_4. 0,01 % $MgSO_4$. Jenaer Erlenmeyerkolben von 100 ccm. Menge der Flüssigkeit 60 *ccm*. Versuchstemperatur 36° C. Farbe beobachtet ohne Schütteln[1]. Geimpft mit 1 ccm einer *Ps. pyocyanea-Kultur* in Fleischwasser.

Zugefügtes KNO_3 %	Farbe nach			
	einem Tage	zwei Tagen	drei Tagen	fünf Tagen
0	gelb	gelb	gelb	braun
0,1	hell-grün	grün	gelb-orange	blau-braun
0,2	grün-blau	blau	blau	dunkelblau-braun
0,4	blau	„	dunkelblau	blau-schwarz
0,6	dunkelblau	dunkelblau	schwarz-blau	schwarz-blau

Tabelle B.

Alles wie bei Tabelle A, nur war die Menge der Flüssigkeit im Erlenmeyerkolben 25 *ccm*.

Zugefügtes KNO_3 %	Farbe nach			
	einem Tage	zwei Tagen	drei Tagen	fünf Tagen
0	gelb	gelb	gelb-blaugrün	braun
0.1	grün-hellblau	grün-hellblau	blau	blau-schwarz
0,2	hellblau	blau	dunkelblau	schwarz
0,4	dunkelblau	dunkelblau	dunkler blau	„
0,6	dunkler blau	dunkler blau	schwarz-blau	„

Aber *nicht jeder Ps. pyocyanea-Stamm* reagiert in der oben dargestellten Weise auf die Zufügung von Kaliumnitrat. Es gab auch Stämme, die, in dünner Schicht an der Luft kultiviert, gute Pyocyaninbildung zeigten, aber in einem Kulturmedium mit Kaliumnitrat keine Spur Pyocyanin bildeten, also sogar das umgekehrte Verhalten wie oben zeigten. Diese Stämme zersetzten das Kaliumnitrat so rasch, daß eine starke Schaumbildung in den Kulturen zu beobachten war. Ich vermute, daß für diese Stämme das Nitrat und seine Hydrierungsprodukte (KNO_2, N_2O) so gute Wasserstoffakzeptoren sind, daß das

[1] Beim Schütteln der Kulturen, denen KNO_3 zugeführt war, wurde die Farbe nicht intensiver. Tatsächlich hat also die Zufügung des Nitrats eine größere Konzentration an nicht reduziertem Pyocyanin zur Folge.

Pyocyanin dann für diese Stämme seine Bedeutung als Katalysator des Dissimilationsprozesses verliert, und daß unter diesen Umständen auch keine Bildung des Pigmentes stattfindet.

IV. Versuche mit Pyocyanin als Wasserstoffakzeptor.

Der direkte Weg um nachzuweisen, daß das Pyocyanin ein Wasserstoffakzeptor ist, würde schwierig sein. Man kann aber indirekt zeigen, daß das Pyocyanin imstande ist, einen unverkennbaren Wasserstoffakzeptor in seiner Wirkung zu vertreten. Es zeigte sich nun, daß das Methylenblau ein Wasserstoffakzeptor ist, mit welchem das Pyocyanin unter denselben Umständen vollkommen vergleichbar ist.

Erster Versuch.

Der erste Versuch, in welchem das Pyocyanin als Wasserstoffakzeptor angewandt wurde, war die Entfärbung desselben durch Formaldehyd in Gegenwart von frischer und dazu geeigneter Milch, also die sogenannte *Schardinger-Reaktion.*

Wie allgemein angenommen, wird bei dieser Reaktion der Formaldehyd durch das Methylenblau dehydriert; es entsteht Ameisensäure und Leukomethylenblau. Ebenso wie in den Versuchen mit Methylenblau, tritt auch in denjenigen mit Pyocyanin eine Entfärbung des Farbstoffes auf. War die Milch nicht fähig, das Methylenblau in Gegenwart von Formaldehyd zu entfärben, so tritt auch keine Entfärbung des Pyocyanins ein. In einem Wort: das Pyocyanin verhält sich genau so wie das Methylenblau unter denselben Umständen, wie man aus untenstehender Tabelle ersehen kann.

Bei jedem Versuche wurde zu 20 ccm Milch 1 ccm einer Lösung von der Zusammensetzung:

Alkoholische Methylenblaulösung	1 ccm
Wasser	38 „
Formaldehyd, 40%ig	1 „

zugegeben.

Die alkoholische Methylenblaulösung enthielt:

Methylenblau	1 g
Alkohol abs.	20 ccm
Wasser	29 „

Für die Versuche mit Pyocyanin wurde in diesen Lösungen statt Methylenblau Pyocyanin angewendet.



Tabelle I.

Die Schardingerreaktion mit Methylenblau und Pyocyanin.
Versuchstemperatur 50° C.

Versuch Nr.		Zugefügt	Zugefügter Wasserstoffakzeptor	Zeit bis Entfärbung	Zugefügter Wasserstoffakzeptor	Zeit bis Entfärbung
1	Milch	Formol	Methylenblau	∽	Pyocyanin	∽
		nichts	"	∽	"	∽
2	"	Formol	"	∽	"	∽
		nichts	"	∽	"	∽
3	"	Formol	"	$3^1/_2$ Min.	"	4 Min.
		nichts	"	*	"	*
4	"	Formol	"	8 Min.	"	10 Min.
		nichts	"	*	"	*

* Nach 15 Minuten sehr geringe Entfärbung.

Wie wir sehen, verhält sich das Pyocyanin bei diesen Versuchen dem Methylenblau durchaus ähnlich.

Zweiter Versuch.

Im zweiten Versuche habe ich zeigen wollen, daß ein aerober Organismus, wie ein Essigbakterium, seine Dissimilations- und Assimilationsprozesse auch dann durchführen kann, wenn statt des freien Sauerstoffs ein Wasserstoffakzeptor im Kulturmedium zugegen ist, und daß es gleichgültig ist, ob dieser Wasserstoffakzepter Methylenblau oder Pyocyanin ist.

Wir gaben in *Einhorn*kölbchen eine Lösung von 2% Glucose oder 2% Mannit in Hefedekokt und fügten nun so viel einer aufgekochten Methylenblau- oder Pyocyaninlösung hinzu, daß der Gehalt an Farbstoff 0,0025% wurde. Jetzt wurde geimpft mit einer Reinkultur von *Acetobacter aceti Beijeri* und die Kölbchen 48 Stunden bei 30° C im Brutschrank belassen. Nach dieser Zeit war im geschlossenen Schenkel des Kölbchens Entfärbung des Farbstoffes und zugleich ein deutliches Wachstum des Bakteriums zu beobachten. In den Fällen, in welchen kein Farbstoff zugefügt worden war, war im geschlossenen Schenkel kein Wachstum zu beobachten. Wo Glucose als Nährsubstrat diente und also Säurebildung eintrat, war das Pyocyanin im offenen Schenkel durch die gebildete Säure rötlich gefärbt. Falls Mannit benutzt wurde und also keine Säureproduktion stattfand, war die Farbe des Pyocyanins im offenen Schenkel blau wie zuvor.

Die Ergebnisse findet man in nachstehender Tabelle II zusammengefaßt. Auch hier kann man wieder sehen, daß das Pyocyanin sich genau so verhält wie das Methylenblau.

Tabelle II.

Versuch mit Acetobacter aceti Beijer.

Kulturmedium: Hefedekokt. Versuchsdauer: 48 Stunden. Temperatur 30° C.

Versuch	Zugefügte Kohlenstoffverbindung	Zugefügter Wasserstoffakzeptor	Geschlossener Schenkel		Offener Schenkel	
			Wachstum	Farbe	Wachstum	Farbe
Geimpft	Glucose	keiner	—	—	+	—
„	Mannit	„	—	—	+	—
„	Glucose	Methylenblau	+	entfärbt	+	blau
„	Mannit	„	+	„	+	„
„	Glucose	Pyocyanin	+	„	+	rot
„	Mannit	„	+	„	+	blau
Nicht geimpft	Glucose	Methylenblau	—	blau	—	„
„	„	Pyocyanin	—	„	—	„
„	Mannit	„	—	„	—	„

Dritter Versuch.

Der dritte Versuch war darauf gerichtet, zu zeigen, daß, wenn man gärendem Mazerationssaft Pyocyanin zufügt, man, ebenso wie nach der Zufügung von Methylenblau, im Versuchsmedium Acetylmethylcarbinol nachweisen kann.

Zur Erläuterung dürfte folgendes dienen. Bekanntlich nimmt *Neuberg* als Zwischenprodukt bei der alkoholischen Gärung Methylglyoxal an und denkt sich hieraus den Alkohol mittels einer gemischten *Cannizzaro*-Umlagerung (Dismutation) mit Acetaldehyd entstanden. Dieser Prozeß läßt sich selbstverständlich auch als eine gekuppelte Dehydrierung und Hydrierung formulieren:

$$CH_3.CO.C\begin{matrix}\diagup OH\\ -OH\\ \diagdown H\end{matrix} + \text{Akzeptor} \longrightarrow CH_3.CO.C\leqslant^{OH}_{O} + \text{Akzeptor-Wasserstoff}$$

und

$$CH_3.CO.C\leqslant^{OH}_{O} \longrightarrow CH_3.C\leqslant^{H}_{O} + CO_2.$$

Bei der normalen Gärung ist der auftretende Akzeptor Acetaldehyd, und dieser wird also in Äthylalkohol übergeführt.

Neuberg und *Reinfurth*[1] haben gezeigt, daß eine Zufügung von Acetaldehyd zu einer gärenden Zuckerlösung zur Folge hat, daß der Acetaldehyd in Acetylmethylcarbinol übergeführt wird. *Kluyver*, *Donker* und *Visser 't Hooft*[2] haben nun in Übereinstimmung hiermit dargetan, daß die Zufügung von einem Wasserstoffakzeptor zu einer gärenden Zuckerlösung, welcher also in dem Prozesse (in der ersten Gleichung), oben dargestellt, als solcher auftreten würde, einen Über-

[1] *Neuberg* und *Reinfurth*, diese Zeitschr. **148**, 553, 1923.
[2] *Kluyver*, *Donker* und *Visser 't Hooft*, ebendaselbst **161**, 362, 1925.

schuß an Acetaldehyd und also auch eine Bildung von Acetylmethylcarbinol zur Folge haben muß. So verursacht die Zufügung von Methylenblau zu einer gärenden Zuckerlösung die Bildung von Acetylmethylcarbinol (bisweilen auch von dem Hydrierungsprodukt des Carbinols, dem 2-3-Butylenglykol).

Ich werde nun zeigen, daß auch die Zufügung von Pyocyanin zu gärendem Mazerationssaft Acetylmethylcarbinol entstehen läßt und diese Substanz nach obiger Auffassung also auch als Wasserstoffakzeptor auftreten kann.

Das Acetylmethylcarbinol wurde nach *Lemoigne* via Diacetyl in das Dimethylglyoxim übergeführt und als Nickeldimethylglyoxim nachgewiesen. Die Versuche wurden angestellt mit Mazerationssaft einer Unterhefe, zu dem 10 % Glucose und 0,1 % Methylenblau oder 0,1 % Pyocyanin zugefügt worden war. Der Mazerationssaft selber enthielt keine Spur von Acetylmethylcarbinol, und die Kontrollproben zeigten nur eine sehr geringe Bildung dieser Substanz.

Aus der Tabelle III ist ersichtlich, wie das Pyocyanin sich auch hier ganz dem Wasserstoffakzeptor Methylenblau ähnlich verhält. Daß das Pigment, wie in den anderen Versuchen, nur einer Reduktion anheimgefallen ist, zeigte sich, indem die Lösung, mit Luft geschüttelt, sofort wieder die Farbe des Pigmentes annahm.

Tabelle III.

Versuch mit Mazerationssaft.

Konzentration des Wasserstoffakzeptors 0,1 %. Versuchstemperatur 30° C. Dauer 2 Stunden.

Zugefügtes Kohlenhydrat	Zugefügter Waserstoffakzeptor	Acetylmethylcarbinol	2-3-Butylenglykol
10 % Glucose	keiner	Spur	—
10 „ „	„	„	—
10 „ „	Methylenblau	++	—
10 „ „	Pyocyanin	++	Spur
Blanko	keiner	—	—
„	„	—	—

V. Über die biologische Bedeutung des Pyocyanins.

Jetzt bleibt noch übrig, die Rolle des als Wasserstoffakzeptor erkannten Pyocyanins im Atmungsprozesse von *Pseudomonas pyocyanea* näher zu betrachten. Stellen wir uns hierbei auf den Standpunkt der „einheitlichen Deutung“ *Oppenheimers*, wie diese unabhängig von *Szent-Györgyi*, von *Fleisch* und von *Kluyver* und *Donker* befürwortet

ist und wobei also die wesentlichen Annahmen der *Wieland*schen und *Warburg*schen Atmungstheorien vereinigt werden.

Wir denken uns, daß in erster Instanz eine Aktivierung des Wasserstoffs in den Atmungssubstraten durch das Bakterienprotoplasma bewirkt wird. Der aktivierte Wasserstoff kann dann entweder sofort an den durch das *Warburg*sche Eisensystem aktivierten Sauerstoff abgegeben werden, oder — und dies wird wohl in den meisten Fällen zutreffen — es wird dabei ein Zwischenkörper, ein Wasserstofftransporteur, auftreten, welcher den Wasserstoff von der Protoplasma-Substrat-Verbindung ablöst und denselben erst nachher auf den aktivierten Sauerstoff überträgt. Es liegt nun auf der Hand, dem Pyocyanin die Rolle eines Wasserstofftransporteurs zuzuschreiben.

Oppenheimer[1] betont nun mit Recht, daß die Bedeutung eines derartigen indirekten Wasserstoffübertragungs-Mechanismus wohl in der dadurch herbeigebrachten Reaktionsbeschleunigung zu suchen sein wird. Wenn also unsere Annahme des Pyocyanins als Wasserstoffakzeptor zutrifft, müssen wir erwarten, daß Stämme von *Pseudomonas pyocyanea* mit stärkerer Pigmentbildung auch einen kräftigeren Stoffwechsel aufweisen als solche mit schwächerer Pigmentbildung. Es ist nun in diesem Zusammenhang wichtig, daß *Furlani*[2] tatsächlich beobachtet hat, daß eine Kultur von *Ps. pyocyanea* mit starker Pigmentbildung in derselben Zeiteinheit einen größeren Stoffumsatz aufwies als eine gleich alte Kultur mit geringer Pigmentbildung. Ohne dies als einen endgültigen Beweis für die gegebene Auffassung zu betrachten, wird dieselbe dadurch doch zweifellos gestützt.

Während obige Betrachtungen sich auf die Rolle des Pyocyanins in der Zelle von *Ps. pyocyanea* beschränken, darf nun weiter nicht vergessen werden, daß das Pyocyanin in den Kulturen dieses Bakteriums zweifellos aus den Zellen hinaustritt und als wasserlöslicher Wasserstofftransporteur für die Kultur als ganze betrachtet noch weit größere Bedeutung erlangt. Es unterliegt kaum einem Zweifel, daß das Pyocyanin eben erst das Leben der *Ps. pyocyanea*-Zellen in den tieferen sauerstofflosen Schichten der Kulturflüssigkeit ermöglicht. Wir haben in Abschnitt II gesehen, wie eine *Ps. pyocyanea*-Kultur, die nicht an der Luft geschüttelt worden ist, aussieht. Nur in einer dünnen Schicht an der Oberfläche kann man die blaue Farbe des Pigmentes beobachten, die tieferen Schichten sind alle nur gelb und gelb-grün gefärbt durch das Fluorescein. Wir sehen also, daß die Dehydrierung des Leukopyocyanins nur in den oberen sauerstoffreichen Schichten stattfindet.

---

[1] Vgl. hierfür *Oppenheimer*, Lehrb. d. Enzyme, S. 498. Leipzig 1927.

[2] *Furlani*, Sitzungsber. d. Math.-naturwiss. Klasse Wien 120, 85 und 86, 1919.



Die tieferen Schichten einer Kultur sind fast ohne Sauerstoff, weil die Mikroben der oberen Schicht den Sauerstoff darin fortwährend verbrauchen und obendrein in dieser Weise das Diffundieren dieses Gases nach tieferen Schichten hemmen werden. Die Oxydation des Wasserstoffes ist also stark lokal und gebunden an diejenige Stelle, wo (neben labilem Wasserstoff) auch Sauerstoff vorhanden sein wird, um das Eisensystem wieder zu beleben. In dieser Hinsicht wird also das Pyocyanin ein Transporteur des Wasserstoffes (aus tieferen Schichten nach oben) sein, weil das Pigment als Leukobase nach oben diffundieren kann und dann in der geeigneten sauerstoffreicheren Zone wieder regeneriert wird. Für die tieferen Schichten, wo der Dissimilationsprozeß des Bakteriums durch Mangel an Sauerstoff fast unmöglich geworden ist, wird das Pyocyanin tatsächlich als Reaktionsbeschleuniger des Oxydationsprozesses seine Hauptrolle spielen. Außerdem war es noch denkbar, daß das Pyocyanin eine Oxydation neben der Eisenoxydation ermöglichen würde. *Meyerhof*[1] hatte einen Zuwachs der Zellatmung beobachten können, wenn Methylenblau als Wasserstoffakzeptor auftrat. Diese Oxydation neben der Eisenoxydation war cyanunempfindlich. Ich konnte feststellen, daß eine verdünnte wässerige Pyocyaninlösung (10 ccm etwa 0,002 bis 0,003%), der 2 bis 5 ccm von einer halb molaren KCN-Lösung zugefügt worden war, nach Reduktion mittels $Na_2S_2O_4$ beim Schütteln an der Luft sofort wieder gebläut wurde, daß also die Abgabe des labilen Wasserstoffes des Leukopyocyanins an den Luftsauerstoff ebenfalls cyanunempfindlich war. Versuche, die angestellt wurden, um zu sehen ob eine *Ps. pyocyanea*-Kultur ihren Stoffwechsel durchführen konnte in Anwesenheit von verschiedenen Mengen KCN, hatten jedoch ein durchaus negatives Resultat. In allen Kulturen, in welchen nach bestimmter Zeit noch CN′ nachzuweisen waren, war auch das Bakterium eingegangen.

Diese Resultate sind wohl in Übereinstimmung mit den Befunden von *Harrison*[2], der gezeigt hat, daß die Oxydation des Leukomethylenblaus an der Luft cyanunempfindlich ist, daß aber die Übertragung des labilen Wasserstoffes von anderen Transporteuren auf das Methylenblau wohl von Spuren Eisen und Kupfer beeinflußt, also durch CN′ stark gehemmt wird.

Auch in diesem Verhalten zeigt also das Pyocyanin wiederum die größte Übereinstimmung mit dem Methylenblau. Wenn es daher gelingen würde, das Pyocyanin in größeren Quantitäten darzustellen, wäre es zweifellos für Stoffwechselversuche vor dem unphysiologischen Methylenblau zu bevorzugen.

---

[1] *Meyerhof*, Pflügers Arch. **169**, 87, 1917; **170**, 367, 1918.

[2] *Harrison*, Biochem. Journ. **21**, 335, 1927.

VI. Versuch einer neuen Einteilung der farbstoffbildenden Bakterien.

Nachdem wir in Abschnitt I gesehen haben, wie wenig die heutige allgemeine Ansicht, soweit es die pigmentbildenden Bakterien betrifft, in Übereinstimmung ist mit den Resultaten älterer und neuerer Forschungen, ist es meines Erachtens nicht überflüssig, eine neue Einteilung der farbstoffbildenden Bakterien zu versuchen. Folgende Einteilung entspricht besser den verschiedenartigen biologischen Bedeutungen der Bakterienpigmente.

I. Gruppe. Zu dieser Gruppe sind zu rechnen die Bakterien, in welchen das Pigment, unter dem Einfluß des Lichtes, die Kohlenstoffassimilation katalysiert.

Hierzu gehören: die Schwefelpurpurbakterien, die Chlorobakterien.

II. Gruppe. Zu dieser Gruppe sind zu rechnen die Bakterien, für welche das Pigment als Sauerstoffspeicherer fungieren kann.

Der vom Pigment gespeicherte Sauerstoff wird bei niedriger O_2-Spannung an die Umgebung abgegeben und kann durch CO und einige andere Gase im Pigment verdrängt werden.

Von einigen Arten dieser Bakterien kann man nur unter bestimmten Bedingungen gefärbte Kulturen bekommen.

Hierzu gehören auf Grund der Untersuchungen *Shibatas* und *Ewarts*:

die farbstoffbildenden Sarcinen; z. B. *Sarcina aurantiaca*, *Sarcina rosea* und *Sarcina lutea*.

Weiter: *B. brunneus*, *B. fuscus*, *B. violaceus*, *B. arborescens*, *B. turcosus*, *B. herveolus*, *B. janthinus* und verschiedene andere.

Micrococcus agilis, *Staphylococcus pyogenes citreus*.

III. Gruppe. Zu dieser Gruppe sind zu rechnen die Bakterien, für welche das Pigment als Wasserstoffakzeptor fungieren kann, indem es den labilen Wasserstoff der Dissimilationssubstrate auf den Luftsauerstoff überträgt.

Hierzu gehört: *Ps. pyocyanea*.

Zusammenfassung.

1. Es wird gezeigt, daß die allgemeinen Ansichten über die Art und die Bedeutung der Bakterienpigmente, wie man diese in den neueren Lehrbüchern erwähnt findet, nicht im Einklang sind mit den Resultaten älterer und neuerer Forschungen.

2. Es werden Beobachtungen erwähnt, aus welchen man schließen kann, daß die Entfärbung des Pyocyanins und die Regeneration des Farbstoffes durch den Luftsauerstoff (wie dies in *Ps. pyocyana*-Kulturen stattfindet) eine biologische Bedeutung haben muß.



3. Es wird eine Methode beschrieben, um mit bestimmten *Ps. pyocyanea*-Stämmen schnell eine gute Pyocyaninbildung zu bekommen.

4. Im Anschluß an dieser Methode wird die Meinung ausgesprochen, daß, ebenso wie dies für die gewöhnlichen Reservestoffe der Fall ist, auch Wasserstoffakzeptoren durch die Mikrobenzelle angelagert werden können.

5. Es werden Versuche beschrieben, aus welchen ersichtlich ist, daß die Überführung des Pyocyanins in die Leukobase seiner Funktion als Wasserstoffakzeptor entspricht.

6. Es wurde festgestellt, daß die Oxydation des Leukopyocyanins zu Pyocyanin durch den Sauerstoff cyanunempfindlich ist.

7. Die biologische Bedeutung des Pyocyanins wird besprochen und es wird die Ansicht geäußert, daß das Pyocyanin in Kulturen als Wasserstoffüberträger bei den Dissimilationsprozessen fungieren kann.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. *A. J. Kluyver* meinen Dank für seine Anregung, Hilfe und Kritik während dieser Arbeit zu sagen.

Über den Angriffspunkt der Hypophysenauszüge.

Von

H. Tangl und L. Hazay.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 24. Oktober 1927.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Seit der Feststellung von *Scharpey-Schafer* und Mitarbeitern, daß Hypophysenextrakte eine Wirkung auf die Harnsekretion ausüben, erschienen zahlreiche Arbeiten, die jedoch leider in dieser Hinsicht keine einheitliche Vorstellung gestatten. Schon über die Wirkungsweise der Hypophysenextrakte gehen die Ansichten auseinander.

So fand *v. d. Velden* bei an Diabetes insipidus leidenden Menschen eine diuresehemmende Wirkung, wogegen *Schafer* und *Hering*, *Magnus*, *Oehme*, *Abel* berichten, daß sich nach subkutaner Pituitrininjektion bei Kaninchen, Katzen und Hunden eine Diurese einstellt. *Konschegg* und *Schuster* geben an, daß bei kleinen Gaben von Hypophysenauszügen Diurese auftritt, daß dagegen bei einer Erhöhung der Menge Hemmung der Diurese erfolgt. Demgegenüber fand wieder *de Motzfeld*, daß nach Verabreichung von Hypophysenauszügen bei verschiedenen Tieren stets eine verschieden große Hemmung eintritt.

Nicht nur hinsichtlich der Wirkungsart sind die Ansichten verschieden, sondern auch bezüglich des Angriffspunktes der Hypophysenextrakte findet sich keine Übereinstimmung. Besonders in neuerer Zeit tritt immer mehr die Ansicht in den Vordergrund, daß die Hypophysenauszüge fast gar nicht renal, sondern extrarenal wirken.

So fand unter anderen *Brunn*, daß nierenlose Tiere, wenn sie Hypophysenauszüge eingespritzt erhalten, eine erheblich größere Menge Wasser im Körper aufspeichern als Tiere, denen keine Auszüge verabreicht werden. *Meyer* und *Meyer-Bisch* untersuchten nach der Verabfolgung von Hypophysenauszügen die Menge der Lymphe sowie deren Eiweiß- und Kochsalzgehalt. Sie fanden eine Verminderung der Lymphemenge und eine Zunahme



der festen Bestandteile und schrieben dies einer primären Wasserretention zu. Dieser Ansicht schlossen sich neuerdings *Molitor* und *Pick* an. Nach ihrer Ansicht liegt das Gebiet der Diuresehemmung des Pituitrins in der Hauptsache im extrarenalen Gewebe und nicht in der Niere. Im Gegensatz zu den erwähnten Autoren fanden wieder andere, wie *Wirz*, *Bauer* und *Aschner*, *Fromherz* und *Oehme*, keinen gesetzmäßigen Einfluß auf die Austauschvorgänge zwischen Blut und Gewebe. *Oehme* suchte auch an nierenlosen Tieren die Frage zu lösen, indem er nach der Injektion von Hypophysenauszügen die Verschiebung des Blutwassergehalts ermittelte, wobei er sich auf den Nachweis der Eiweiß- und Hämoglobinmenge im Blute stützte. Es ließ sich keine Änderung im Gehalt dieser beiden Stoffe vor und nach der Einspritzung feststellen.

Dieser Widerspruch in den Literaturangaben veranlaßte uns, festzustellen, wo eigentlich der Angriffspunkt der Hypophysenauszüge liegt. Unsere Untersuchungen wurden vor allen Dingen an überlebenden Froschnieren vorgenommen, da wir auf diese Weise unabhängig vom Körper die direkte Wirkung auf die Niere ermitteln konnten. Gleichzeitig suchten wir auch die Frage zu beantworten, welche Wirkung unsere Hypophysenauszüge auf den intakten Forschkörper entfalten, und welche Unterschiede sich in der Menge des Harns und des Konzentrierungsvermögens der Niere ergeben.

I.

Methodik. Bei den Untersuchungen der überlebenden Nieren von Rana esculenta verwendeten wir die Methode von *Barkan*, *Broemser* und *Hahn*.

Die herauspräparierte Niere wird mit einer gepufferten Durchströmungsflüssigkeit durchspült, wobei der Druck so gehalten wird, daß er den normalen Verhältnissen entspricht. Nach diesem Verfahren gelang es den genannten Autoren, die Niere in normaler Funktion während 8 bis 9 Stunden zu erhalten. Eine ausführliche Beschreibung findet sich in der Zeitschr. f. Biol. 74, 1921. Wir versetzten die Durchströmungsflüssigkeit pro Liter noch mit 1 ccm einer 1%igen Trypanblaulösung, womit wir das Konzentrierungsvermögen der Niere bestimmten. Außer bei den Normalversuchen wurden der den Nieren verabreichten Lösung noch Hypophysenextrakte in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt, und zwar 0,05 bis 1,5 ccm der standardisierten Lösung eines Präparats der chemischen Fabrik Richter, Budapest. Alle Versuche wurden an männlichen Fröschen ausgeführt, da bei diesen die Ureterkanüle viel leichter eingeführt werden kann als bei weiblichen Tieren. Die Versuchsdauer betrug 5 bis 6 Stunden, da die Nieren nach dieser Zeit ihre normale Funktion einstellten. Den Harn sammelten wir in einer kleinen kalibrierten Eprouvette. Die Farbenkonzentration bestimmten wir mit dem *Authenriet*schen Kolorimeter, wobei als Standardlösung wie bei der Durchströmungsflüssigkeit pro Liter 1 ccm 1%ige Trypanblaulösung verwendet wurde. Es wurden zahlreiche Versuche an überlebenden Nieren ausgeführt, deren Durchschnittsergebnisse in der Tabelle I zusammengestellt sind.

Tabelle I.

Harnmenge in ccm.

Stunde	R	R + Tb	I. R + Tb + 0,05 ccm Hypophys.	II. R + Tb + 0,075 ccm Hypophys.	III. R + Tb + 0,10 ccm Hypophys.	IV. R + Tb + 0,125 ccm Hypophys.	V. R + Tb + 0,150 ccm Hypophys.	VI. R + Tb + 0,175 ccm Hypophys.	VII. R + Tb + 1,00 ccm Hypophys.	VIII. R + Tb + 1,250 ccm Hypophys.	IX. R + Tb + 1,500 ccm Hypophys.
1.	0,85	0,96	1,17	1,85	0,80	1,25	1,02	0,88	0,74	1,12	0,91
2.	0,71	0,84	0,92	1,51	0,68	1,08	0,83	0,67	0,51	0,76	0,68
3.	0,84	1,04	0,76	1,19	0,57	0,94	0,65	0,45	0,38	0,48	0,30
4.	0,63	0,95	0,74	1,15	0,41	0,68	0,50	0,28	0,31	0,37	0,00
5.	0,79	0,89	0,96	1,38	0,67	1,01	0,58	0,37	0,44	0,32	0,18

R = *Ringer*sche Lösung. Tb = Trypanblau.

Tabelle II.

Farbenkonzentration im Harn.

Stunde	R + Tb	I. R + Tb + 0,05 ccm Hypophys.	II. R + Tb + 0,75 ccm Hypophys.	III. R + Tb + 0,10 ccm Hypophys.	IV. R + Tb + 0,125 ccm Hypophys.	V. R + Tb + 0,150 ccm Hypophys.	VI. R + Tb + 0,175 ccm Hypophys.	VII. R + Tb + 1,00 ccm Hypophys.	VIII. R + Tb + 1,250 ccm Hypophys.	IX. R + Tb + 1,500 ccm Hypophys.
1.	0,004	0,003	0,002	0,003	0,004	0,004	0,005	0,003	0,005	0,005
2.	0,006	0,005	0,003	0,004	0,006	0,005	0,006	0,008	0,007	0,008
3.	0,005	0,006	0,006	0,008	0,009	0,009	0,008	0,009	0,007	0,009
4.	0,004	0,004	0,006	0,007	0,007	0,006	0,008	0,006	0,009	0,008
5.	0,004	0,002	0,005	0,004	0,005	0,006	0,007	0,005	0,008	0,008

R = *Ringer*sche Lösung. Tb = Trypanblau.

Die Versuchsresultate lassen sich noch anschaulicher durch die Kurven der nachfolgenden Abbildung wiedergeben.

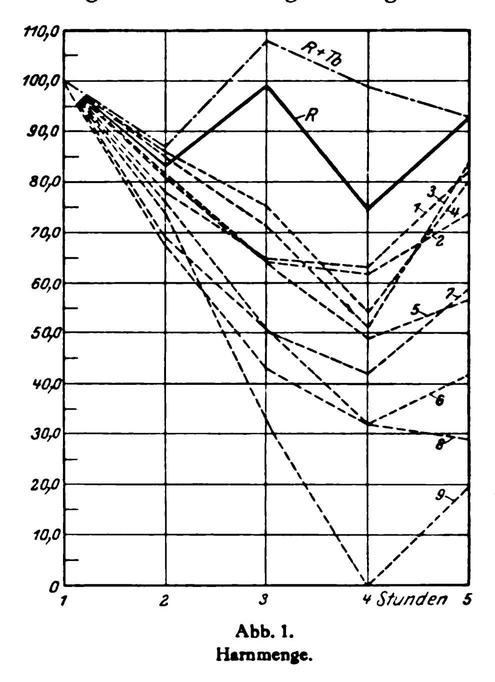


Abb. 1.
Harnmenge.

Es ist hieraus ersichtlich, daß die Hypophysenauszüge auf die überlebende Niere einen nicht unbedeutenden Einfluß ausüben. Erstens läßt sich ein größerer Unterschied in der Harnmenge feststellen. Die Nieren, die Hypophysenextrakte erhielten, lieferten viel weniger Harn, als diejenigen ohne Zusatz. Die Verminderung der Harnmenge war jedoch nicht gleichmäßig, die Abnahme erfolgte langsam bis zur dritten bis vierten Stunde, später hört dann die Wirkung der Hypophysenauszüge, abgesehen von den Fällen, in denen die größten Gaben verabreicht wurden, vollkommen auf, und die Harnmenge vermehrte sich wieder. Leider sind die überlebenden Nieren trotz größter Vorsicht in der sechten bis siebenten Stunde unbrauchbar geworden, so daß wir den weiteren Anstieg der Harnsekretion nicht mehr verfolgen konnten. Diese Verringerung der Harnmenge könnte man ausschließlich auf eine Blutgefäßverengung zurückzuführen, doch geht aus Tabelle II hervor, daß sich die Konzentration des Harns, gemessen an der Trypanblaumenge, bestimmt vergrößerte. Daraus geht hervor, daß die Niere in ihrer Tätigkeit nicht behindert worden ist, da sie ja in der Zeit, als die Harnsekretion geringer war, einen viel konzentrierteren Harn lieferte. Je größer die Menge der Hypophysenextrakte war, desto mehr konzen-

trierte die Niere den Harn. Ebenso wie sich die Harnmenge verminderte, erhöhte sich das Konzentrierungsvermögen der Niere. Nach 3 bis 4 Stunden verminderte sich wieder die Konzentration des Farbstoffes im Harn.

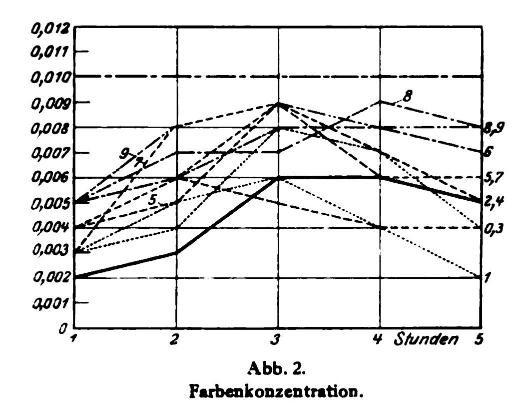


Abb. 2.
Farbenkonzentration.

Da, wie aus den Tabellen ersichtlich ist, die Hypophysenauszüge einen bedeutenden Einfluß auf die Niere ausüben, so drängt sich die Frage auf, in welcher Weise die Hypophysenextrakte auf die Nieren wirken, d. h. auf welchen Apparat sie wirken. Da der Harn durch die Wirkung der Extrakte konzentriert wird, seine Menge infolgedessen abnimmt, so muß man hieraus unter Zugrundelegung der Theorie von *Cushny* schließen, daß der Angriffspunkt der Hypophysenauszüge nicht in den Nierenknäueln, sondern in den gewundenen Kanälchen liegt.

II.

Der zweite Teil unserer Versuche diente zur Entscheidung der Frage, welche Wirkung Hypophysenauszüge aufweisen, wenn man sie mit Trypanblau subkutan in den Froschkörper einführt.

Methodik: Die Frösche wurden während des Versuchs in Glasschalen gebracht, in denen sie sich kaum bewegen konnten. Der Harn wurde in einem in eine kleine Glaskugel mündenden gläsernen Dauerkatheter aufgefangen. Die Glaskugel hatte ein kleines Steigrohr, durch das der Harn zu jeder Zeit herausgenommen werden konnte. Bei den ersten Versuchen war der Katheter dauernd in die Kloake eingeführt, später aber erfolgte die Einführung viertelstündlich, wobei die gleichen Versuchsergebnisse erhalten wurden. Außer den Kontrolltieren hatten die Frösche subkutan in steigender Menge Hypophysenauszüge bekommen. Die Ausführung geschah unter den gleichen Bedingungen, wie im ersten Teile unserer Versuche beschrieben wurde.

Die Durschnittsergebnisse sind in den beiden folgenden Tabellen und Abbildungen zusammengestellt.



Tabelle III.

Menge des Harns in ccm.

Stunde	R + Tb	I. R + Tb + 0,2 ccm Hypophys.	II. R + Tb + 0,4 ccm Hypophys.	III. R + Tb + 0,6 ccm Hypophys.	IV. R + Tb + 0,8 ccm Hypophys.	V. R + Tb + 1,0 ccm Hypophys.	VI. R + Tb + 1,25 ccm Hypophys.	VII. R + Tb + 1,50 ccm Hypophys.	VIII. R + Tb + 1,75 cmm Hypophys.	IX. R + Tb + 2,00 ccm Hypophys.
1.	0,87	1,00	1,54	0,93	0,88	1,12	0,74	0,84	0,98	0,59
2.	0,96	0,92	1,29	0,76	0,65	0,83	0,39	0,53	0,56	0,27
3.	0,91	0,96	1,42	0,79	0,69	0,89	0,47	0,59	0,61	0,31
4.	0,95	1,10	1,40	0,87	0,81	0,97	0,41	0,48	0,53	0,38
5.	0,83	1,05	1,34	0,98	0,76	0,85	0,56	0,63	0,59	0,25
Gewicht des Frosches:	88,3 g	92,2 g	102,5 g	83,4 g	97,9 g	112,7 g	76,1 g	89,8 g	110,0 g	69,8 g

R = *Ringer*sche Lösung. *Tb* = Trypanblau.

Tabelle IV.

Farbenkonzentration im Harn.

Stunde	Tb	I. R + Tb + 0,2 ccm Hypophys.	II. R + Tb + 0,4 ccm Hypophys.	III. R + Tb + 0,6 ccm Hypophys.	IV. R + Tb + 0 8 ccm Hypophys.	V. R + Tb + 1,0 ccm Hypophys.	VI. R + Tb + 1,25 ccm Hypophys.	VII. R + Tb + 1,50 ccm Hypophys.	VIII. R + Tb + 1,75 ccm Hypophys.	IX. R + Tb + 2,00 ccm Hypophys.
1.	0,002	0,003	0,002	0,003	0,003	0,003	0,002	0,002	0,003	0,003
2.	0,003	0,003	0,004	0,004	0,005	0,004	0,006	0,004	0,005	0,004
3.	0,003	0,002	0,003	0,005	0,003	0,004	0,003	0,005	0,005	0,006
4.	0,002	0,003	0,003	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,002	0,003
5.	0,001	0,002	0,002	0,002	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000
Gewicht des Frosches:	88,3 g	95,2 g	102,5 g	83,4 g	97,9 g	112,7 g	76,1 g	89,8 g	110,0 g	69,8 g

R = *Ringer*sche Lösung. *Tb* = Trypanblau.

Aus den Tabellen ist ersichlich, daß die Hypophysenauszüge eine Wirkung auf die Harnmenge und Farbenkonzentration ausübten. Wir bemerken eine Diuresehemmung, die immer stärker wird, je größer die Hypophysengaben sind. Die Konzentration des Farbstoffes stand

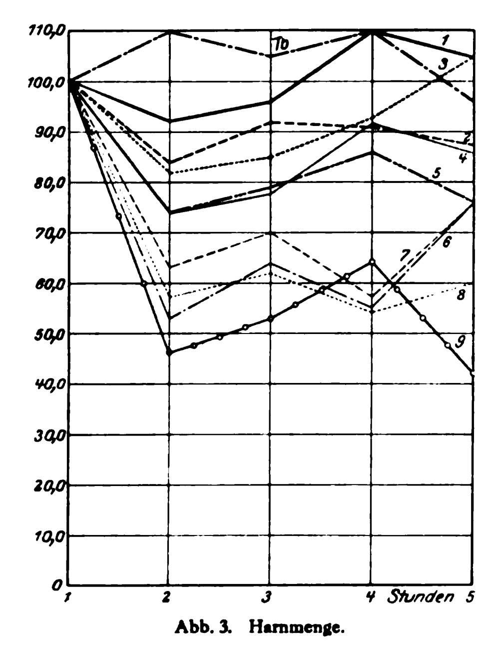


Abb. 3. Harnmenge.

Abb. 4. Farbenkonzentration.

dabei im umgekehrten Verhältnis zur Harnmenge. Vergleicht man die Ergebnisse des ersten und zweiten Abschnittes untereinander, so ergibt sich, daß die Wirkung der Hypophysenauszüge im ersten Teil viel stärker war, als im zweiten. Diese Tatsache ist jedoch insofern leicht erklärlich, als die Wirkungsstoffe hier in viel konzentrierterer

Lösung zu den Nieren gelangten, als im zweiten Teil unserer Versuche, bei dem die Hypophysenauszüge subkutan verabreicht worden sind. Jedenfalls läßt sich aus den Ergebnissen schließen, daß die Hypophysenextrakte nicht nur extrarenal wirken, sondern einen bedeutenden Einfluß auch auf die Nieren ausüben.

Zusammenfassung.

Die Hypophysenauszüge haben nicht nur auf das extrarenale System einen bedeutenden Einfluß, wie dies in neueren Arbeiten betont wird, sondern üben eine bedeutende Wirkung auch auf die Nieren aus.

Die Versuche wurden unter der Leitung von Herrn Prof. *G. Farkas* ausgeführt, dem wir für die uns zuteil gewordenen wertvollen Ratschläge zu großem Dank verpflichtet sind.

Literatur.

Abel, XI. Intern. Phys.-Kongr. Edinburgh 1923. — *Bauer* und *Aschner*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 1922. — *Barkan*, *Broemser*, *Hahn*, Zeitschr. f. Biol. 1921. — *Brunn*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 1921. — *Fromherz* und *Oehme*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 1923. — *Hering*, Quarl. Journ. Exp. Phys. 1908. — *Konschegg* und *Schuster*, Deutsch. Med. Wochenschrift 1915. — *Meyer*, Zeitschr. f. allgem. Pathol. 1909. — *Molitor* und *Pick*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 1923 u. 1925. — *de Motzfeld*, Journ. of exper. Med. 1917. — *Oehme*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 1919. — *C.* und *M. Oehme*, Deutsch. Arch. f. Klin. Med. 1918. — *Schafer* und *Magnus*, Journ. of Phys. 1895. — *Scharpey* und *Schafer*, ebendaselbst 1895. — *v. Velden*, Berl. Klin. Wochenschr. 1913. — *Wirz*, Dissertation Bonn 1923.

Über die Mehrphasenwirkung des KCN auf die lebende Zelle.

(Vorläufige Mitteilung.)

Von

Michael S. Resnitschenko (Moskau).

(Aus dem Laboratorium für experimentelle Biologie des Moskauer Zooparks[1].)

(Eingegangen am 24. Oktober 1927.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

I.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir den Verlauf der Oxydationsprozesse des mit Cyankalium vergifteten Protoplasmas.

Uns interessierte hauptsächlich die Frage, wie sich der Sauerstoffverbrauch der Zelle in dem Zeitraum von der Zufügung des KCN bis zu dem Punkte, wo die Oxydationshemmung ihre maximale Größe erreicht, ändert.

Die Dynamik des Prozesses der KCN-Vergiftung ist noch wenig erforscht, es schien uns daher zweckmäßig zu sein, unsere Aufmerksamkeit besonders diesem Gegenstand zuzuwenden.

II.

Als Versuchsobjekt dienten uns die befruchteten Eier von Ascaris megalocephala, die ein sehr bequemes Material für physiologische Experimente darstellen.

Die Einwirkung von KCN auf die Atmung dieser Eier untersuchte vor kurzem *M. Zawadowsky*[2]. Der Autor stellte ein eigenartiges Verhalten der Eier fest. Selbst die höchsten Konzentrationen von Cyankalium — bis 2 Mol. — sind nicht imstande, den Sauerstoffverbrauch vollständig zu

[1] Die Arbeit wurde mit Unterstützung des Timirjazeff-Forschungsinstituts ausgeführt.

[2] *M. M. Zawadowsky*, Biochimica e Terapia Sperimentale **12**, 7, 1925; W. Roux' Arch. f. Entw.-Mech. **109**, Heft 1, 1926.



hemmen. Im Laufe einiger Stunden nimmt der Sauerstoffverbrauch allmählich ab und erreicht eine gewisse Höhe, die 24 Stunden anhält. Diese minimale Atmungsgröße bleibt in 2 mol. KCN-Lösung sehr konstant und zeigt keine Tendenz zur Verminderung.

Auf den ersten Blick widersprechen diese Tatsachen der gut bekannten Eigenschaft des Cyankaliums, die Oxydation schon in minimalen Dosen zu hemmen. Die Atmung von Ascariseiern wird nur durch 2 mol. KCN-Lösung wesentlich beeinflußt.

Niedrigere als 0,001 mol. Lösungen üben auf die Eier überhaupt keinen merkbaren Einfluß aus (*Zawadowsky*, l. c.). Aber diese Resistenz der Eier von Ascaris megalocephala wird durch die Beschaffenheit der Eimembranen erklärt (*Zawadowsky*, l. c.). Nach eingehenden Untersuchungen von *M. Zawadowsky*[1] sind die Eier von einem Membransystem umgeben.

Die innerste fibröse Membran besitzt eine lipoide Natur und stellt ein ausgezeichnetes Modell einer halbdurchlässigen Membran dar. Sie ist nur für lipoidlösliche Stoffe durchlässig; Salze, Säuren, nicht zu starke Basen usw. dringen nicht durch (*Zawadowsky*, l. c.).

So entwickelt sich z. B. das Ei in konzentrierten Lösungen von $HgCl_2$, in 2% KOH und 2% HCl vollkommen normal. Wahrscheinlich läßt diese Membran nur sehr kleine Mengen von KCN durch, und deshalb wird die Atmung der Eier selbst bei höchsten Konzentrationen von Cyankalium nicht vollständig gehemmt. Die Reaktion des mit der halbdurchlässigen Membran nicht geschützten Protoplasten wäre natürlich derjenigen von anderen Objekten (Seeigelei, Blutkörperchen usw.) ähnlich. Aber gerade dieser Umstand — die schwere Durchlässigkeit der Eimembran für KCN — erlaubte uns, manche bis jetzt noch nicht bekannten Tatsachen kennenzulernen.

III.

Die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs wurde nach der *Warburg*schen Methodik ausgeführt[2]. Das Haldane-Barcroftmanometer mit konstantem Volumen befand sich im Wasserthermostaten bei 29° C. Die Menge des verbrauchten Gases wurde nach der von *O. Warburg* angegebenen Formel[3]:

$$x = h\left[\frac{V_g \frac{273}{T} + V_f\,\alpha}{10000}\right]$$

berechnet. In unseren Versuchen war das Gefäßvolumen (V) gleich 29,5 ccm, das Flüssigkeitsvolumen (V_f) 20 bis 21 ccm, das Gasvolumen (V_g) 8,5 bis 9,5 ccm, die absolute Temperatur (T) 302°.

---

[1] *M. M. Zawadowsky*, Mitteil. d. Univ. Schanjawsky 1, 1915 (russisch mit französischem Resümee).

[2] *O. Warburg*, Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin 1926.

[3] *Derselbe*, diese Zeitschr. 100, 230, 1919; 142, 317, 1923.

Die Konstante unseres Manometers war dementsprechend 0,8 bis 0,9 cmm O_2. Die Anwendung der *Warburg*schen Methodik erlaubt uns, den Sauerstoffverbrauch in kurzen nachfolgenden Zeiträumen genau zu ermitteln, was für unsere Zwecke sehr wichtig war. Das umständliche *Winkler*sche Verfahren war in unserem Falle überhaupt kaum anwendbar. Die Eier von Ascaris megalocephala wurden gewaschen, um die epitheliale Membran und Gonadenflüssigkeit zu entfernen (vgl. *N. Kosmin*[1]), und die feine Suspension in den Atmungstrog eingebracht. Die außerordentlichen Eigenschaften unserer Versuchsobjekte gestatten es, die Eier direkt in 0,4 mol. NaOH-Lösung, die gleichzeitig als Antisepticum und Absorbens von CO_2 diente, zu bringen. Wie schon erwähnt, schädigt ziemlich starkes Alkali die Eier nicht.

IV.

Der Sauerstoffverbrauch der sich entwickelnden normalen Eier von Ascaris megalocephala wird durch Abb. 1 dargestellt. Die Kurve steigt sehr langsam an. In einer Stunde erhöht sich der O_2-Verbrauch ungefähr auf 1,5 %, und im Laufe von 16 Stunden auf 22 %.

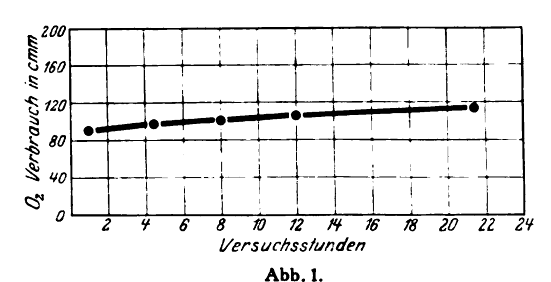


Abb. 1.

Sauerstoffverbrauch der sich entwickelnden Eier von Ascaris megalocephala.

Diese Steigerung ist wahrscheinlich mit der fortschreitenden Entwicklung verbunden. Ähnliches hat *O. Warburg* für die Atmung der Seeigeleier festgestellt, aber in diesem Falle war die Steigerung des O_2-Verbrauchs bedeutend größer[2]. Der Unterschied findet seine Erklärung in der Tatsache, daß die absolute Entwicklungsgeschwindigkeit der Seeigeleier größer ist, als diejenige der Ascariseier[3]. Nach 24 Stunden bei 19° bilden die Seeigeleier eine schwimmende Gastrula, und die Eier von Ascaris megalocephala bei optimaler Temperatur — 29° — erreichen in derselben Zeit das Stadium von 8 Blastomeren[3]. Entsprechend dem langsamen Tempo der Entwicklung, steigt der Sauerstoffverbrauch ebenso langsam an.

[1] *N. Kosmin*, Trans. of the Labor. of Exper. Biol. of the Zoop. of Moscow 4, 1927. (Im Druck.)

[2] *O. Warburg*, Pflügers Arch. 160, 324, 1915.

[3] *Zawadowsky* und *Sidorow*, Trans. of the Labor. of Exper. Biol. of the Zoop. of Moscow 3, 1927.

In Versuchen mit KCN beabsichtigten wir die Eintrittsgeschwindigkeit des Cyankaliums durch die lipoide Membran, das Verhalten der minimalen Atmungsgröße in verschiedenen Konzentrationen von KCN, und die Grenze der spezifischen Wirkung desselben zu verfolgen. Die von uns angewendeten Konzentrationen von KCN schwankten von 0,1 Mol. bis 3,2 Mol. Die erste Messung des Sauerstoffverbrauchs der in KCN befindlichen Eier wurde 30 Minuten nach der Zufügung von KCN ausgeführt. Eine 3,2 mol. bzw. 20 %ige Lösung von Cyanid hemmt die Atmung der Eier nicht vollständig, eine 0,01 mol. Lösung übt auf die Oxydationsprozesse nur schwache Wirkung aus. Daraus kann man schließen, daß KCN die lipoide Membran durchdringt, wenn auch in sehr geringen Mengen (vgl. auch *Zawadowsky*, l. c.). Eine solche verhältnismäßig schwache Oxydationshemmung läßt sich nur durch die Eigenschaften der lipoiden Membran, die für KCN schwer durchlässig ist, erklären. (Hier sei daran erinnert, daß schon die 0,001 mol. KCN-Lösung die Atmung der Seeigeleier und Warmblütergewebe fast vollständig hemmt.)

Aus unseren Versuchen mit einer 3,2 mol. Lösung von KCN ergibt sich ein interessanter Befund. In den ersten 30 Minuten nach der Zufügung des Cyanids verbrauchten die Eier 60 % mehr Sauerstoff als in derselben Zeit vor dem Anfang des Versuchs. In den nachfolgenden 30 Minuten bleibt der O_2-Verbrauch auf demselben (d. h. erhöhtem im Vergleich zum normalen) Niveau, öfters aber zeigt sich eine Tendenz zur Verminderung. Weitere Messungen ergeben eine rasche Verminderung des O_2-Verbrauchs. 7 bis 8 Stunden nach dem Anfang des Versuchs erreicht der Sauerstoffverbrauch seine minimale Größe, die ohne Änderung mehrere Stunden und sogar Tage anhält.

Dieser Vorgang wird durch die folgende Tabelle gekennzeichnet.

Tabelle I.

KCN-Mole	Sauerstoffverbrauch in cmm															
	Vor dem Zusatz von KCN	In Cyankalium														
	Versuchsstunden															
	1/2	1	1 1/2	2	2 1/2	3	3 1/2	4	4 1/2	5	7 1/2	8	8 1/2	9	18 1/2	19
3,2	33	34	55	51	45	42	33	30	24	16	10	9	9	8	9	8

Die Reaktion des Protoplasmas auf Cyanid verläuft also in mehreren Phasen. Die erste Periode ist durch einen im Vergleich zum normalen

erhöhten Sauerstoffverbrauch charakterisiert. Diese Phase bezeichnen wir als „paradoxe Phase". Am Anfang dieser Periode steigt die Kurve des O_2-Verbrauchs schnell an. In den nachfolgenden Stunden aber sinkt die Kurve allmählich und geht schließlich in eine gerade Linie über, die parallel der Abszisse verläuft.

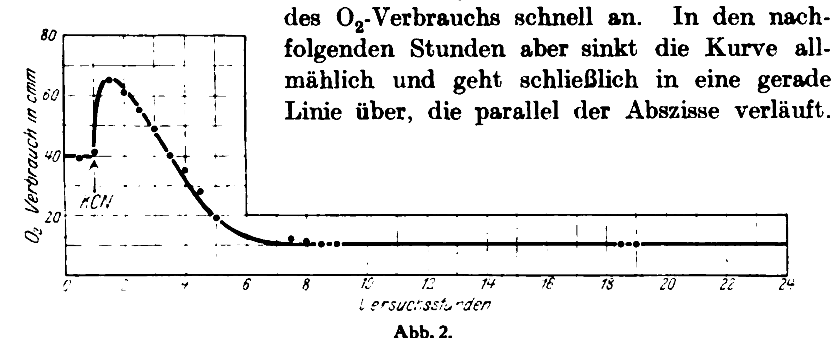


Abb. 2.
Sauerstoffverbrauch der Eier von Ascaris megalocephala in 3,2 mol. KCN-Lösung.

Eier, die sich in 3,2 mol. KCN-Lösung befinden, verbrauchten den Sauerstoff im Laufe von 3 bis 4 Tagen; bis zum siebenten Tage war der Verbrauch noch merkbar.

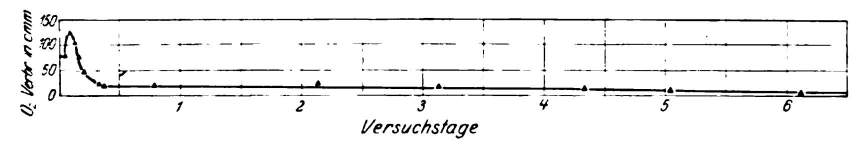


Abb. 3.
Sauerstoffverbrauch der Eier von Ascaris megalocephala in 3,2 mol. KCN-Lösung im Laufe von sechs Tagen.

Ein ähnliches Bild zeigen die Versuche mit niedrigeren Konzentrationen von KCN. In 1,6 mol. Lösung des Cyanids ist die paradoxe Phase ebensogut ausgeprägt, wenn auch die Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs etwas kleiner ist und die normale Atmung nur um 45% erhöht ist. In der sechsten Stunde des Versuchs erreicht der O_2-Verbrauch seine minimale Größe; von diesem Punkt an verläuft die Kurve parallel der Abszisse. Der minimale Verbrauch hält sich ebenfalls mehrere Tage, aber sein absoluter Wert ist höher als in der 3,2 mol. Lösung von KCN; wenn im letzten Falle das Minimum etwa 25% der normalen Atmung beträgt, so ist es in 1,6 mol. Lösung bereits 40% derselben. Mit der Verminderung der Konzentration des KCN wird die paradoxe Phase immer undeutlicher. Aber zu gleicher Zeit vermindert sich auch die Atmungshemmung. Der minimale Sauerstoffverbrauch, welcher in jeder Konzentration mehrere Stunden und Tage konstant verbleibt, steigt immer höher.

Die angeführte Tabelle II und Abb. 4, 5 und 6 erläutern das Gesagte.

Tabelle II.

Sauerstoffverbrauch im Laufe der 24 Stunden des Versuchs.

KCN-Mole	Sauerstoffverbrauch in cmm																	
	Vor dem Zusatz von KCN	In Cyankalium																
	Versuchsstunden																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	—	18	19	20	21	22	23	24
3,2	80	126	105	75	47	—	—	22	20	—	—	—	20	—	—	—	—	—
1,6	80	112	99	70	61	38	—	—	34	34	—	—	—	—	—	—	34	—
0,8	80	105	86	62	54	48	—	44	—	—	—	—	—	—	—	—	—	40
0,4	80	100	72	57	50	50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	50	50	—
0,2	80	96	78	64	56	56	—	—	—	56	—	56	—	—	—	—	—	56
0,1	80	88	76	62	63	—	—	62	—	—	—	62	—	—	—	—	—	—
0,05	80	86	76	64	64	—	—	64	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,01	80	77	73	68	—	—	—	66	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

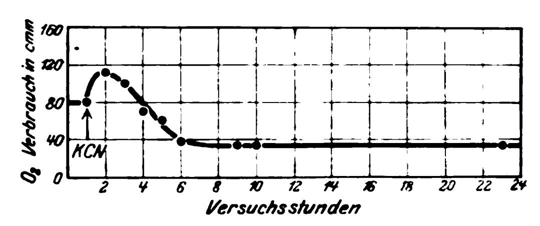


Abb. 4.
Sauerstoffverbrauch der Eier von Ascaris megalocephala in 1,6 mol. KCN-Lösung.

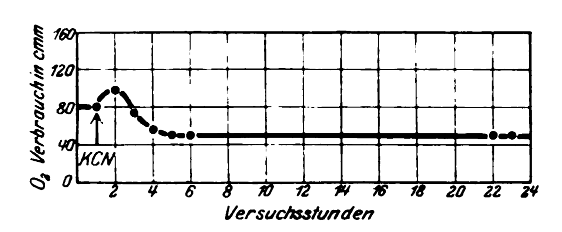


Abb. 5.
Sauerstoffverbrauch der Eier von Ascaris megalocephala in 0,4 mol. KCN-Lösung.

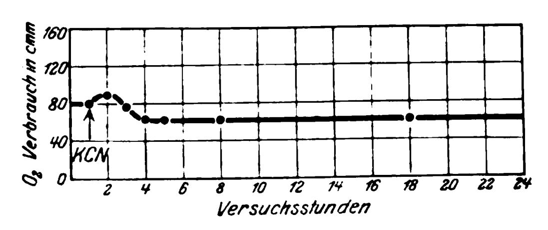


Abb. 6.
Sauerstoffverbrauch der Eier von Ascaris megalocephala in 0,1 mol. KCN-Lösung.

Die Gesetzmäßigkeit zwischen der Größe der Erhöhung in der ersten Phase und der Höhe des konstanten minimalen Verbrauchs in der letzten Phase läßt sich besser ersehen, wenn wir die Kurven des Sauerstoffverbrauchs in verschiedenen Konzentrationen des KCN aufeinanderlegen (Abb. 7).

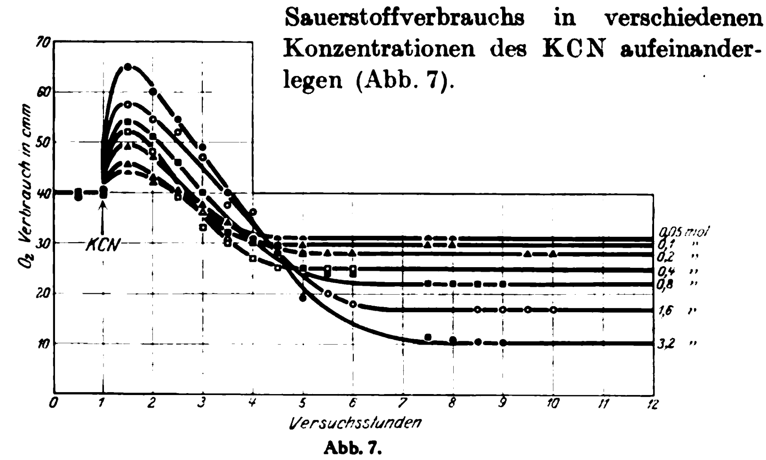


Abb. 7.
Zusammenfassung der Versuche mit 3,2 bis 0,05 mol. KCN-Lösungen.

Die Größe der Erhöhung in den ersten Stunden ist der Konzentration von KCN direkt proportional, und die Höhe des minimalen Sauerstoffverbrauchs derselben umgekehrt proportional. Wenn wir den minimalen und maximalen Sauerstoffverbrauch der Eier in verschiedenen Konzentrationen des Cyanids in Prozenten der normalen Atmung ausdrücken, so wird die große Ähnlichkeit in der Änderung der beiden extremen Punkte ersichtlich (vgl. Tabelle III). Beide, Maximum und Minimum, sind die Funktionen einer und derselben unabhängigen Variablen — der Konzentration des KCN.

Eine weitere Besprechung der Ergebnisse unserer Versuche erfolgt an anderer Stelle. Im folgenden geben wir die Kontrollversuche wieder, welche dafür sprechen, daß die beschriebenen Tatsachen nicht durch die Methodik vorgetäuscht sind.

Tabelle III.

Sauerstoffverbrauch der Eier in der ersten und achten Stunde des Versuchs.

KCN-Mole	Erhöhung des O_2-Verbrauchs in der ersten Stunde in %	Hemmung des O_2-Verbrauchs in der achten Stunde in %	KCN-Mole	Erhöhung des O_2-Verbrauchs in der ersten Stunde in %	Hemmung des O_2-Verbrauchs in der achten Stunde in %
3,2	62	73	0,2	22	30
1,6	45	58	0,1	15	23
0,8	35	45	0,05	10	20
0,4	30	38	0,01	—	17

Die befruchteten Eier von Ascaris megalocephala wurden durch Behandlung mit absolutem Alkohol getötet, wobei sich die lipoide Membran löste, und mit destilliertem Wasser gewaschen. 100 bis 200 mg abgetöteter Eier sollten eine Oberfläche darstellen, die der von lebenden Eiern annähernd gleich ist. Auf dieser konnten wir das Verhalten des KCN studieren.

Die Eier wurden in den Atmungstrog mit 0,4 mol. NaOH-Lösung eingebracht und ihr Sauerstoffverbrauch ohne KCN und nach der Zufügung desselben gemessen. Der geringe O_2-Verbrauch der toten Eier wird durch KCN nicht beeinflußt, wenigstens nicht in der Richtung einer Erhöhung desselben, was zu erwarten wäre, wenn KCN sich auf der Oberfläche der Eier oxydieren würde. In der Tabelle IV ist das Protokoll eines solchen Versuchs wiedergegeben.

Tabelle IV.

Sauerstoffverbrauch der toten Eier.

	Sauerstoffverbrauch in cmm							
	0,4 m NaOH					0,4 m NaOH + 1,6 m KCN		
	1 — e 30′	2 — e 30′	3 — e 30′	4 — e 30′	5 — e 30′	6 — e 30′	7 — e 30′	8 — e 30′
Mit Alkohol getötete Eier . .	47	37	22	20	13	13	12	16

Auf Grund dieser Versuche kann man schließen, daß die Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs in der paradoxen Phase nicht durch die Reagenzien bedingt ist, sondern eine natürliche Reaktion des Protoplasmas darstellt.

V.

Eine nähere Betrachtung der geschilderten Tatsachen erlaubt den Schluß, daß das von uns beobachtete Bild des Sauerstoffverbrauchs keine Ausnahme darstellt und auch für andere Objekte typisch ist.

Zawadowsky (l. c.) hat festgestellt, daß KCN in sehr hohen Konzentrationen den O_2-Verbrauch der Eier von Ascacis megalocephala nicht vollständig hemmt. *Buchanan*[1] zeigte, daß m/25000 KCN die Atmung der Planarien auf etwa 60% herabsetzt. Aber der minimale O_2-Verbrauch, der 40% des normalen beträgt, verbleibt 24 Stunden ohne Änderung. Der Prozeß ist umkehrbar; nach der Entfernung des KCN steigt die Atmung auf ihre normale Höhe und überschreitet diese sogar um 25%. Ähnliches haben auch andere Autoren gefunden (*Allen*[2], *Child*[3]). Die letzteren beobachteten einen minimalen Sauerstoffverbrauch, der nach der Entfernung des KCN auf die normale Höhe ansteigt und gleichfalls diese überschreitet. Eine Erhöhung des O_2-Verbrauchs in der ersten Zeit nach der Zufügung des Cyankaliums haben die genannten Autoren nicht beobachtet, in unseren

[1] *J. Buchanan*, Journ. of Exper. Zool. 44, Nr. 1, 285, 1926.
[2] *G. Allen*, Amer. Journ. of Physiol. 48, 93, 1919.
[3] *C. Child*, ebendaselbst 48, 372, 1919.

Versuchen tritt diese Erhöhung aber sehr deutlich hervor. *Hyman*[1], der die Oxydationsprozesse der in m/150000 KCN gebrachten Planarien studierte, beschreibt die Phase der schwachen Erhöhung der Atmung in der ersten halben Stunde des Versuchs. Nach der darauf folgenden Depression steigt die Atmung der in frisches Wasser gebrachten Planarien wieder auf eine übernormale Höhe.

Auf Grund der angeführten Tatsachen kann man sich die Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs (unsere „paradoxe Phase") als eine Reaktion des Protoplasmas auf sehr kleine Dosen von KCN vorstellen. Der minimale Verbrauch, der nach einer gewissen Zeit eintritt, entspricht den großen Quantitäten Cyanid.

Unser Fall bietet für dieses Schema folgendes Beispiel:

Die halbdurchlässige, faserige Membran der Ascaris stellt für KCN ein wesentliches Hindernis vor. Die ersten Anteile von KCN, welche die Membran in der ersten halben Stunde des Versuchs durchdringen, müssen sehr klein sein (vgl. *Zawadowsky*[2]). Gerade zu dieser Zeit beobachten wir den erhöhten Sauerstoffverbrauch. Nach 6 bis 8 Stunden, wenn ein Gleichgewicht zwischen den KCN-Konzentrationen im Ei und im äußeren Medium eingetreten ist, wird die Atmung gehemmt und auf ein gewisses Minimum herabgesetzt. Die hohen Konzentrationen bewirken also die große Hemmung. Die Ergebnisse der zitierten Autoren werden diesem Schema ebensogut entsprechen. Den parenchymatösen Körper der Planarien soll das KCN rasch durchdringen. Ein endgültiges Gleichgewicht zwischen den KCN-Konzentrationen im Körper des Tieres und in der umgebenden Flüssigkeit wird schnell eintreten, die Periode, in der die Mengen von KCN im Körper noch sehr klein sind, ist von kurzer Dauer. Infolgedessen muß die Phase des erhöhten Sauerstoffverbrauchs sehr kurz sein und kann übersehen werden. Letzteres war wahrscheinlich der Fall in den Versuchen von *Buchanan* (l. c.), der nach der *Winkler*schen Titrationsmethode arbeitete und die erste Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs erst 2 Stunden nach der Zufügung von KCN ausführte. *Buchanan* stellte jedoch den erhöhten Verbrauch nach dem Auswaschen des Cyanids fest, dessen Menge im Körper der Planarien sehr klein sein sollte. Diese Annahme stützt sich auf *Hymans* (l. c.) Experimente, der sechsmal so kleine Konzentrationen von KCN verwendete und die Erhöhung schon in der ersten halben Stunde festgestellt hat.

Die von uns beobachteten Erscheinungen liefern weiteres Material zum Verständnis des Prozesses der Cyanidvergiftung.

Der Endpunkt dieses Prozesses — die Oxydationshemmung und ihr Wesen — ist hauptsächlich von *O. Warburg* und seinen Mitarbeitern eingehend studiert[3] worden.

[1] *L. Hyman*, Amer. Journ. of Physiol. **48**, 340, 1919.

[2] *M. Zawadowsky*, Trans. of the Labor. of exper. Biol. of the Zoop. of Moscow **1**, 182, 1926.

[3] *O. Warburg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **66**, 305, 1910; **76**, **331**, 1912; diese Zeitschr. **119**, 134, 1921; **136**, 226, 1923; **152**, 477, 1924; *H. Blaschko*, ebendaselbst **175**, 1926.

Da die hier angeführten Tatsachen den wichtigsten Punkten der *Warburg*schen Theorie nicht widersprechen, gehen wir auf diese nicht weiter ein.

Die eigenartige Beschaffenheit unseres Versuchsobjekts gestattete auch, die Anfangsstadien der KCN-Vergiftung zu beobachten.

Der Prozeß verläuft in mehreren Phasen; nach der kurzen Periode der Stimulation der Atmung (Reaktion auf kleine Dosen von KCN), sinkt der Sauerstoffverbrauch allmählich und erreicht schließlich ein Minimum, welches konstant bleibt. Die Größe dieses Minimums ist in verschiedenen Konzentrationen des KCN verschieden und diesen umgekehrt proportional. Man konnte erwarten, daß schon die niedrigsten der angewendeten KCN-Konzentrationen groß genug sind, um die Atmung vollständig zu hemmen. Das ist aber nicht der Fall.

Infolgedessen muß man annehmen, daß die Menge des durch die lipoide halbdurchlässige Membran diffundierten KCN sehr klein, aber für verschiedene Konzentrationen verschieden ist. Für jede Konzentration muß ein gewisses Gleichgewicht zwischen den ungleichen KCN-Mengen auf beiden Seiten der halbdurchlässigen Membran (faserige Membran des Eies) eintreten. Diese Erscheinung ist durch die spezifischen physikalisch-chemischen Eigenschaften der Eimembran bedingt. Aber die Erhöhung der Atmung in der ersten Phase der Cyanidvergiftung hat einen allgemeineren Charakter.

Die letzte Erscheinung stellt uns mehrere Fragen, die zu untersuchen der Zweck weiterer Arbeiten sein wird.

Ultrafiltration kleiner Flüssigkeitsmengen mittels der Zentrifuge.

Von

A. Tóth (Pécs, Ungarn).

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 24. Oktober 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Den Gedanken, die Zentrifugalkraft als Triebkraft für Ultrafiltrationszwecke anzuwenden, gaben Beobachtungen bei den Versuchen mit der Elektrodialyse (1), wo unter gewissen Bedingungen eine Ultrafiltration durch die Kollodiummembran während des Zentrifugierens stattfand.

Daß die Zentrifugalkraft für Ultrafiltrationszwecke anwendbar ist, ergibt sich auch schon aus theoretischen Überlegungen. Berechnet man die Kraft, die auf eine zentrifugierte Masse als Zentrifugalkraft ausgeübt wird, so ergibt sich nach der Formel $P = \frac{m \cdot v^2}{r} = \frac{4\pi^2 r m}{T^2}$ (wo m die zentrifugierte Masse, r den Krümmungsradius und T die Umlaufszeit in Sekunden bedeutet), daß bei einer Zentrifuge mit 10 cm Radius bei einer Umdrehungszahl von 3000 pro Minute auf eine Masse von 5 g ein Druck von etwa 5 Atm. ausgeübt wird.

Reicht der Druck mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe zur Ultrafiltration aus, so wird die mit der Zentrifuge zu entfaltende Kraft erst recht zu diesem Zwecke ausreichen. Der Vorgang ähnelt dabei der Ultrafiltration mit Überdruck.

Es soll jedoch auf die Differenzen der Kraftverhältnisse bei den beiden Anordnungen hingewiesen werden. Bei der Anordnung mit der Wasserstrahlpumpe und auch bei der Ultrafiltration mit Überdruck bleibt die auf die Filteroberfläche ausgeübte Kraft, insofern die Saugwirkung der Pumpe und der angewandte Überdruck konstant gehalten wird, auch konstant. Wogegen bei der Zentrifuge die bei der Berechnung

der Zentrifugalkraft in Betracht kommende Masse (m) der zu filtrierenden Flüssigkeit während des Filtrierens abnimmt, was eine Abnahme der Zentrifugalkraft bewirkt, die jedoch dadurch, daß dabei der Massenmittelpunkt der zentrifugierten Flüssigkeit vom Drehzentrum gleichzeitig immer mehr entfernt wird, d. h. der Krümmungsradius r zunimmt, teilweise wenigstens kompensiert wird.

So auf der Hand liegend es aber auch scheint, daß die Zentrifugalkraft zu Ultrafiltrationszwecken verwendbar ist, so waren doch gewisse Schwierigkeiten bei der praktischen Anwendung dieses Prinzips vorhanden. So z. B. die Frage der anzuwendenden Membransubstanz. Es können wohl Kollodiummembranen, wie sie bei der üblichen Ultrafiltration gebraucht werden, auch hier verwendet werden. Beim Zentrifugieren trocknet aber der sich mit keiner Flüssigkeit berührende Membranteil leicht aus, so daß er sich von der stützenden Unterlage abhebt und der Filter für weitere Benutzung unbrauchbar wird, obwohl es aus praktischen Gründen vorteilhaft wäre, denselben Filter mehrmals nacheinander gebrauchen zu können.

In der vorliegenden Arbeit soll über Versuche berichtet werden, die zur Ausgestaltung einer geeigneten Versuchsanordnung zur Ultrafiltration mittels der Zentrifuge und zum Auswählen geeigneter, gegenüber dem Austrocknen widerstandsfähiger Membransubstanzen gemacht worden sind.

Abb. 1. *MR* Metallring, *ZG* Zentrifugenglas, *PK* Poröser Körper.

Beschreibung der Versuchsanordnung.

Die Versuche sind mit einem Apparat[1] ausgeführt worden, der so zusammengestellt war, wie Abb. 1 zeigt. *ZG* ist ein gewöhnliches starkwandiges Zentrifugenglas von der üblichen Form und Größe. In diesem geht die Ultrafiltration vor sich. In die Öffnung desselben wird ein Metallring (*MR*) eingesetzt, der einerseits mit einer Krempe an den Rand des Zentrifugenglases anstemmt, mit einer anderen aber das Filtersystem im Inneren des Zentrifugenglases hält. Dieses letztere besteht aus einem porösen Körper (*PK*), der als Unterlage für die Filtermembran dient, und aus der Membran selbst. Als poröser Körper wurde ein zentrifugenglasähnliches Rohr angewendet, das am oberen Ende einen dickeren, in den Metallring passenden Teil hat. Es bestand aus der Masse P_{28} der staatlichen Porzellanmanufaktur in Berlin. Der Fassungsraum der Röhre beträgt

[1] Der Apparat wird durch die Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf, Berlin, geliefert. D. R.-P. a.

etwa 6 ccm. (Bei größeren Zentrifugen für größere Flüssigkeitsmengen können entsprechende größere Röhren verwendet werden.)

Das Anlegen der Membran geschieht in der üblichen Weise durch Ausgießen des Rohres mit der Lösung der anzuwendenden Membransubstanz und Fixieren derselben nach Abtropfen der überflüssigen Lösung mit einer der Natur der Membransubstanz entsprechenden Fixierflüssigkeit.

Will man die Röhre reinigen oder eine neue Membran anlegen, so werden sie zunächst im Trockenschrank vollkommen getrocknet und dann ausgeglüht. Geht man beim Erhitzen und besonders beim Abkühlen vorsichtig vor, so können die Röhren beliebig oft ausgeglüht und wieder benutzt werden. Der an der inneren Oberfläche des Rohres sitzende Membranteil kann nach der Veraschung einfach mechanisch entfernt werden. Den in den Poren sitzenden Aschenteil kann man dadurch entfernen, daß man das Rohr einige Male mit destilliertem Wasser auszentrifugiert.

Um die Durchlässigkeit der Membran zu prüfen, ist eine Kolloidreihe nach *Liesegang*: Kolloidchemische Technologie (2) hergestellt worden, die aus folgenden Gliedern bestand:

1. Verdünnte Berlinerblau-Lösung (durch die Reaktion $3\,K_4FeCy_6 + 4\,FeCl_3$ hergestellt und mit Wasser so weit verdünnt, bis die Lösung im Reagenzglas durchsichtig wurde).

2. 2,5 % $Fe(OH)_3$ (aus dem 10 %igen Ferrum oxydatum dialysatum des D. A. B. durch Verdünnen hergestellt).

3. 1 %ige Kollargollösung.

4. 1 %ige Hämoglobinlösung (durch Hämolyse von roten Blutkörperchen hergestellt. Die Prozentzahl bedeutet, daß 1 ccm rote Blutkörperchen in 100 ccm destilliertem Wasser hämolysiert sind).

Versuche mit Kollodiummembranen.

Die Anwendungsmöglichkeiten von Kollodiummembranen für Ultrafiltrationszwecke sind aus den Arbeiten von *Bechhold* (3) u. a. m. hinlänglich bekannt, es erübrigt sich daher, hier auf sie näher einzugehen. Es sollen bloß die bei der beschriebenen Anordnung sich ergebenden besonderen Verhältnisse besprochen werden.

Für Ultrafiltrationszwecke mittels der Zentrifuge eignet sich Eisessigkollodium ganz ausgezeichnet. Besonders dickere Membranen aus Eisessigkollodium halten acht- bis zehnmaliges Zentrifugieren ganz gut aus. Membranen aus einer äther-alkoholischen Lösung sind weniger geeignet, da sie beim Zentrifugieren viel leichter austrocknen.

Was die Durchlässigkeit der Eisessigkollodiummembranen beim Zentrifugieren anbelangt, soll hervorgehoben werden, daß zum Zurückhalten eines und desselben Kolloids bei der Zentrifuge, dem angewandten höheren Druck entsprechend im allgemeinen etwas dickere Membranen nötig sind als bei der Wasserstrahlpumpe.

Es sind z. B. aus einer 10 %igen Stammlösung durch Verdünnen mit Eisessig 8 bis 6 bis 4 %ige Lösungen und Membranen mit diesen Lösungen hergestellt worden. Die Membranen sind alle gleich lange gewässert und dann durch sie eine 1 %ige Hämoglobinlösung filtriert worden. Die Membran aus der 4 %igen Lösung ließ den Farbstoff fast vollkommen durch, die aus der 6 %igen hielt den Farbstoff teilweise zurück, und das Filtrat durch die Membran aus der 8 %igen Lösung war nicht nur farbstoff-, sondern auch eiweißfrei. Durch 8 %ige Membranen bekam ich aus Sera, die mit Ringerlösung auf das Doppelte verdünnt wurden, immer ein eiweißfreies Filtrat.

Die Anfertigung der Membran geschieht am besten folgenderweise: Man zentrifugiert das Rohr zunächst mit destilliertem Wasser angefüllt solange, bis alles Wasser durchgetrieben ist, man gießt dann das Rohr mit der entsprechend verdünnten Kollodiumlösung voll und zentrifugiert bei etwa 2000 Touren 2 bis 3 Minuten lang. Dann gießt man das überflüssige Kollodium aus dem Rohre und läßt so vollkommen abtropfen. Vor dem Fixieren sollen die Röhren noch etwa 5 Minuten lang an der Luft stehen; sie werden erst dann ins Wasser getaucht, sonst entstehen in der Membran kleine Gasbläschen. Die Röhren werden vor der Benutzung 24 Stunden gewässert und eventuell noch mit destilliertem Wasser auszentrifugiert. Sie sind dauernd unter Wasser aufzubewahren.

Versuche mit Viskosemembranen.

Es ist dann des weiteren versucht worden, die Membran aus einer wässerigen Lösung herzustellen. Von den Celluloselösungen kam als solche die Viskose in Betracht, die die Cellulose in alkalischer Lösung enthält.

Die ersten angewandten Lösungen stammten aus der Spinnstofffabrik Zehlendorf, wofür ich der Leitung des dortigen Laboratoriums auch an dieser Stelle meinen besonderen Dank ausspreche. Da aber das Material im Handel kaum erhältlich ist und sich nicht lange hält, habe ich versucht, die Lösung selbst herzustellen, und ein Teil der Versuche ist mit solchen selbsthergestellten Lösungen ausgeführt worden.

Als dem Ziel am meisten entsprechend ergaben sich bei der Herstellung der Lösung folgende Mengenverhältnisse. wobei als Ausgangssubstanz Verbandwatte verwendet wurde:

3 g Verbandwatte werden mit 30 g 18%iger NaOH 1 Stunde stehengelassen. Dann wird die NaOH durch Ausdrücken zwischen Filtrierpapier so weit entfernt, daß das Gewicht der durchtränkten Watte etwa 8 bis 10 g beträgt. Die Watte fühlt sich dabei fast vollkommen trocken an. In diesem Zustande wird die Watte zur sogenannten Vorreife in einer gut schließenden Pulverflasche bei Zimmertemperatur 3 Tage lang stehengelassen, dann mit einer Schere fein zerkleinert, mit 1,5 ccm Schwefelkohlenstoff versetzt (feuergefährlich!), damit gut vermischt und verschlossen, etwa 2 Stunden lang stehengelassen. Dabei verwandelt sich die durch die NaOH größtenteils in Na-Cellulose übergeführte Substanz in das sogenannte Cellulosexanthogenat, und die dabei entstehende gelbe, in braun übergehende Farbe ist der Indikator, wie lange man den Schwefelkohlenstoff auf die Na-Cellulose einwirken lassen soll. Die Substanz soll eine tief orange gelbe Farbe haben, darf aber nicht braun werden. Das Xanthogenat wird zuletzt bei 16° C in 20 ccm n NaOH gelöst. Je höher die Temperatur ist, bei der die Lösung desselben erfolgt, desto dünnflüssiger wird die resultierende Lösung. Bei 16° erhält man eine Lösung, die noch tropfenflüssig ist und die ohne weiteres zum Ausgießen der Röhre benutzt werden kann. Die Lösung soll im Eisschrank aufbewahrt werden. Ihre Viskosität nimmt mit der Zeit zu, bis endlich die ganze Masse zu einem Gel erstarrt. Solange sie zwar schon fadenziehend, aber noch flüssig ist, kann sie mit NaOH verdünnt und zur Herstellung von Filmen benutzt werden.

Um aus der Viskoselösung eine Membran zu bekommen, muß sie zunächst gefällt werden. Dies kann durch die verschiedensten Salze und Säuren bewirkt werden. In den vorliegenden Versuchen ist zu diesem Zwecke Ammoniumsulfat und Schwefelsäure verwendet worden. Am besten fixiert man zuerst mit der Salzlösung und dann mit der Säure. Als beste Fixationsmethode ergab sich folgendes Vorgehen:

Das Rohr wird mit der tropfenflüssigen Viskoselösung vollgegossen. Am besten läßt man die Lösung eine Weile im Rohre stehen, damit sie in die Poren desselben hineindringt, eventuell zentrifugiert man das Rohr mit der Lösung angefüllt. Dann gießt man die überflüssige Lösung aus dem Rohre und nachdem sie gut abgetropft ist, fixiert man die Membran in der folgenden Reihenfolge: 5 % Amm. sulf., 10% Amm. sulf., 2% Schwefelsäure, 4% Schwefelsäure. Das Rohr wird in der angegebenen Reihenfolge je 5 Minuten lang in den obigen Lösungen belassen, wobei es mit der entsprechenden Lösung angefüllt und in sie eingetaucht wird. Nach dem Fixieren sind die Röhren noch wenigstens 1 Stunde lang zu wässern und vor der Benutzung zwei- bis dreimal mit destilliertem Wasser angefüllt zu zentrifugieren.

Es sind zunächst Versuche mit verschieden verdünnten Viskoselösungen angestellt und dabei sowohl die Fixierungsflüssigkeit als die Fixationsdauer variiert worden.

Versuch I. Das Rohr wurde mit einer unverdünnten Lösung (Viskose Zehlendorf) ausgegossen, 1 Stunde lang in einer Lösung fixiert, die 10% Ammoniumsulfat und 5% Schwefelsäure enthielt, und die obigen Kolloide in der angegebenen Reihenfolge filtriert. Das Rohr wurde nach jedem Versuch mit Wasser ausgespült.



Alle vier Kolloide sind von der Membran zurückgehalten worden. Das Filtrat der Hämoglobinlösung war nicht nur farbstoff-, sondern auch eiweißfrei.

Versuch II. Membran aus einer Vikoselösung hergestellt, die mit 15% NaOH 1 : 2 verdünnt wurde, 1½ Stunden in der bei Versuch I angegebenen Weise fixiert.

Resultat wie beim ersten Versuch, mit dem Unterschied, daß das Filtrat der Hämoglobinlösung mit Sulfosalicylsäure eine leichte Trübung zeigte.

Versuch III. Membran aus einer Viskoselösung hergestellt, die mit 15% NaOH 1 : 3 verdünnt wurde. Zur Fixierung der Membran ist das Rohr zuerst mit 1 : 2, dann mit 1 : 1 mit Wasser verdünnter Fixierflüssigkeit vollgegossen und dann erst in die unverdünnte Fixierlösung für 15 Minuten eingetaucht.

Resultat wie oben. Beim Hämoglobin farbstoff- und eiweißfreies Filtrat.

Versuch IV. Membran aus 1 : 6 mit 15% NaOH verdünnter Viskose hergestellt und in der bei Versuch III angegebenen Weise fixiert.

Resultat wie bei Versuch III.

Es ergab sich also aus diesen Versuchen zweierlei:

1. daß die in der beschriebenen Weise hergestellten Viskosemembrane gegen Austrocknen recht widerstandsfähig sind, und

2. daß die Viskoselösung, mit NaOH bis 1 : 6 verdünnt (die Verdünnung 1 : 3 war schon tropfenflüssig) und nur 10 Minuten fixiert, aus der zur Prüfung dienenden Kolloidreihe, *wenn sie in der angegebenen Reihenfolge filtriert werden*, Hämoglobin noch sicher zurückhält.

In den weiteren Versuchen also, wo selbsthergestellte Lösungen verwendet worden sind, sind die Mengenverhältnisse bei der Herstellung derselben schon von vornherein so gewählt, daß eine tropfenflüssige Lösung resultierte, und die Fixierung geschah überall in der im allgemeinen Teil angegebenen Weise, in vier Stufen.

Wurde in diesen Versuchen die Reihenfolge der Kolloide beim Filtrieren wie bei den bisher beschriebenen Versuchen eingehalten, so war das Resultat auch immer dasselbe, d. h. alle vier Kolloide sind von den Membranen zurückgehalten worden. Hat man aber die Kolloide etwa in umgekehrter Reihenfolge genommen, so hat sich die Membran sowohl für das Hämoglobin, als für das Kollargol als durchgängig erwiesen und erst das Eisenhydroxyd ist zurückgehalten worden. Solche Membranen, die nun einmal mit Eisenhydroxyd behandelt worden sind, sind auch für Kollargol und Hämoglobin undurchlässig geworden. Durch dieses letztere ist also eine dichtende Wirkung auf

die Membran ausgeübt worden, für deren Zustandekommen zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen werden konnten.

Man hätte zunächst an eine mechanische Wirkung denken und den Vorgang sich so vorstellen können, daß die Eisenhydroxydteilchen die Poren der Membran so verengen oder verstopfen, daß sie für die Hämoglobinmoleküle auch undurchgängig werden. Für die Möglichkeit des Zustandekommens einer solchen Wirkung spricht der Umstand, daß das Waschwasser nach dem Fixieren der Membran, nach 3 maligem Zentrifugieren immer noch sauer reagiert. Es werden also aller Wahrscheinlichkeit nach Spuren von Schwefelsäure in den Poren der Membran festgehalten.

Man könnte sich aber auch vorstellen, daß an der Membran eine polare Adsorption von Eisenhydroxyd stattfindet und das adsorbierte Kolloid das Hindurchtreten eines entgegengesetzt geladenen Kolloids durch die Membran verhindert. Es sind die Wanderungsrichtungen sowohl der Membransubstanz als auch der in Frage kommenden Kolloide mit der durch *Ettisch* und *Deutsch* (4) angegebenen Anordnung festgestellt worden. Dabei hat sich ergeben, daß die Möglichkeit einer Adsorption des positiven Eisenhydroxyds an der negativen Viskosemembran gegeben ist. Und da Hämoglobin und Kollargol negative Kolloide sind, würde die erwähnte dichtende Wirkung aus polaren Adsorptionserscheinungen auch abzuleiten sein. Zur Entscheidung dieser Frage bedarf es jedoch weiterer diesbezüglichen Untersuchungen.

Die Versuche sowohl in dieser Richtung, als zum Ausprobieren anderer aus wässerigen Lösungen herstellbaren Membransubstanzen werden weitergeführt.

Es soll noch bemerkt werden, daß zur Filtration von grobdispersen Systemen, wie z. B. Bakterienaufschwemmungen usw., der Apparat nach Art der Chamberlainkerzen auch ohne Membran benutzt werden kann.

Zusammenfassung.

1. Es wurden Ultrafiltrationsversuche mittels der Zentrifuge und mit kleinen Flüssigkeitsmengen, bis 5 bis 6 ccm, angestellt. Es wird die Versuchsanordnung beschrieben.

2. Von den Kollodiumlösungen eignet sich Eisessigkollodium besser zu Ultrafiltrationszwecken mittels der Zentrifuge, als die ätheralkoholische Lösung, da letztere leichter austrocknet. Zum Erzielen desselben Filtereffektes ist bei der Zentrifuge eine etwas dickere Membran anzuwenden als bei der Wasserstrahlpumpe.

3. Es wurde versucht, Membrane aus einer wässerigen Celluloselösung herzustellen. Als solche ist Viskose verwendet worden. Es



wird die Herstellung sowohl der Viskoselösung als einer Membran aus derselben beschrieben.

4. Die Durchlässigkeit der Membran wurde mit einer Kolloidreihe geprüft, die aus Berlinerblau, Eisenhydroxyd, Kollargol und Hämoglobin bestand.

5. Die Versuchsergebnisse werden besprochen.

Die Untersuchungen sind unter Leitung des Herrn Prof. *Rona* ausgeführt mit einer Unterstützung seitens der ungarischen Regierung durch das Collegium Hungaricum in Berlin, denen ich auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank ausspreche.

Literatur.

1) *Tóth*, diese Zeitschr. 189, 270, 1927. — 2) *Liesegang*, Kolloidchem. Technologie, Lfg. 1, 2, S. 69. — 3) *Bechhold*, Zeitschr. f. physik. Chem. 60. 257 bis 318, 1907. — 4) *Ettisch-Deutsch*, ebendaselbst 28, 153, 1927.

Weitere Untersuchungen über die Methylierungsfunktion der Schilddrüse.

Von

Bernhard Stuber und **Fritz Stern.**

(Aus der Medizinischen Klinik zu Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 25. Oktober 1927.)

In einer früheren Mitteilung[1] konnten wir den experimentellen Beweis erbringen, daß beim Kaninchen die *Methylierung* der *Guanidinessigsäure* zu Kreatin an die *Funktion* der *Schilddrüse* geknüpft ist. *Schilddrüsenlose* Tiere hatten diese Fähigkeit *völlig verloren*. Wurden jedoch derartige Tiere mit *Schilddrüsensubstanz*, oder mit *Jod*, oder mit *Blut* von normalen Tieren gefüttert, so zeigten sie *erneut* Methylierungsvermögen. Es schien uns nun von Interesse, diese Versuche auf eine breitere Basis zu stellen und dementsprechend auch andere Laboratoriumstiere in den Bereich unserer Untersuchungen einzubeziehen. Vor allem aber war noch zu entscheiden, inwieweit andere innersekretorische Drüsen sich an diesem Methylierungsvorgange beteiligen bzw. nach Schilddrüsenausfall ihn kompensieren können, oder ob es sich bei der Methylierung der Guanidinessigsäure um eine ganz spezifische Leistung der Schilddrüse handelt. Daß im tierischen Organismus sich Methylierungsprozesse häufig abspielen, ist bekannt. Daß diese Vorgänge viel zahlreicher sind, als wir bislang wissen, dürfte sicher sein. Auch sind wir über deren biologische Bedeutung noch sehr wenig unterrichtet. Zweifelsohne fällt ihnen aber eine hohe physiologische Dignität im Zellgeschehen zu. Es sind Beispiele bekannt, wo der Eintritt von Methylgruppen als eine Entgiftung toxisch wirkender Substanzen aufgefaßt werden muß.

Wir machten es uns deshalb zur weiteren Aufgabe, festzustellen, ob auch die Methylierbarkeit noch anderer Körper im tierischen Organismus an die Leistung der Schilddrüse geknüpft ist, oder ob etwa gerade der Methylierungsprozeß der Guanidinessigsäure zu Kreatin

[1] Diese Zeitschr. 1**13**, 221, 1923.

im Sinne einer spezifischen Substrateinstellung zu einer Funktion der Schilddrüse betrachtet werden muß.

Als Versuchstiere dienten uns außer Kaninchen noch Katzen und Hunde. Die Kreatin-Kreatininbestimmungen wurden nach der Methode von *Folin*, wie in unsere früheren Arbeit, durchgeführt. Auch bezüglich der Blutentnahmen verfuhren wir genau wie in unserer ersten Mitteilung. Um Wiederholungen zu vermeiden, verweisen wir darauf. Der Gang unserer Untersuchungen ist am besten aus den im folgenden wiedergegebenen Protokollen zu entnehmen.

Die bei den Kaninchen angewandte Dosis von 0,2 g Guanidinessigsäure konnte bei Hunden und Katzen wegen des Auftretens toxischer Symptome nicht gegeben werden. Es wurde deshalb bis auf 0,05 g pro Dosis herabgegangen. Dabei zeigten sich keinerlei Vergiftungserscheinungen.

Die Versuche der Tabellen I bis VI bestätigen zunächst unsere früheren Ergebnisse von der Abhängigkeit der Methylierung der Guanidinessigsäure von der Funktion der Schilddrüse. Dieser damals für das Kaninchen erhobene Befund wird in gleicher Weise auch für Hund und Katze als gültig nachgewiesen. Von den Organpräparaten (Hypophysenvorder- und -hinterlappenextrakte, Thyroxin, Thyreoglandol und Epithelkörperchenextrakt „Collip") erwiesen sich nur die Schilddrüsenpräparate bei thyreoidektomierten Tieren wirksam. Auch Menschen- und Rinderblut zeigten diesen Erfolg, desgleichen das Blutultrafiltrat. Da letzteres Spuren von Jod enthielt, nach der Methode von *Groak*[1] bestimmt, so dürfte das positive Ergebnis darauf zu beziehen sein.

In Tabelle VII und VIII finden sich zwei Versuche, bei denen der Einfluß der Kastration auf die Methylierung geprüft wurde. Sie zeigen, daß die Kastration die Methylierung völlig intakt läßt, ein Befund, der schon von *Tomita*[2] erhoben wurde.

Um nun die Bedeutung der Schilddrüse für die Methylierung noch anderer Substanzen festzustellen, verabfolgten wir Hunden subkutan Pyridin als Pyridinsulfat. Von *W. His*[3] wurde zuerst der Nachweis erbracht, daß bei Hunden nach Fütterung von Pyridin im Harn Pyridylmethylammoniumhydroxyd auftritt. Er konnte die Base als Chloroplatinat aus dem Urin isolieren. Wir folgten bei der Darstellung des Platinsalzes den Angaben von *His* und von *Tomita* (l. c.). Zur Identifizierung des Platinsalzes der Base kam die Bestimmung des Schmelzpunktes und des Platingehaltes zunächst in Frage. Ersterer schwankt nach den Daten der Literatur zwischen 203° bis 211°. Der letztere beträgt, berechnet für $(C_5H_5N \cdot CH_3Cl)_2\ PtCl_4 : Pt = 32{,}74\%$. Beide Bestimmungen wurden, soweit die erhaltenen Substanzmengen dazu

[1] Diese Zeitschr. **175**, 455, 1926.
[2] Ebendaselbst **116**, 55, 1921.
[3] Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **22**, 1887.

Tabelle I.

Kaninchen, weiblich, Gewicht 3500 g.

	Präformiertes Blutkreatinin mg	Gesamtblutkreatinin mg
Am 16. XI. 1926 0,2 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	2,22	—
5 Minuten nach der Injektion . .	2,27	—
15 „ „ „ „ . .	2,73	—
30 „ „ „ „ . .	2,27	—
Am 18. XI. 1926 Thyreoidektomie.		
Am 24. XI. 1926 0,2 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	2,50	7,50
5 Minuten nach der Injektion . .	2,54	7,31
15 „ „ „ „ . .	2,50	5,90
30 „ „ „ „ . .	2,36	5,45
Am 10. I. 1927 um 10h15′, 12h30′ und 6h je 2 ccm Thyreoglandol subkutan.		
Am 11. I. 1927 um 9h 2 ccm Thyreoglandol, um 10h 0,2 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	1,43	4,73
5 Minuten nach der Injektion . .	1,87	4,93
15 „ „ „ „ . .	1,70	4,50
30 „ „ „ „ . .	1,57	4,73

Tabelle II.

Kaninchen, männlich, Gewicht 4000 g.

	Präformiertes Blutkreatinin mg	Gesamtblutkreatinin mg
Am 27. I. 1927 0,2 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	1,55	7,78
5 Minuten nach der Injektion . .	1,69	7,86
30 „ „ „ „ . .	1,77	8,00
Am 15. II. 1927 Thyreoidektomie.		
Am 10. III. 1927 0,2 g Guanidinessigsäure i. v.		
5 Minuten nach der Injektion . .	1,56	7,00
15 „ „ „ „ . .	1,56	6,66
30 „ „ „ „ . .	1,56	6,10
45 „ „ „ „ . .	1,56	5,12
Am 10. III. 1927 um 6h abends 0,5 mg Thyroxin (*Henning*) subkutan.		
Am 11. III. 1927 um 10h morgens 0,5 mg Thyroxin (*Henning*) subkutan.		
Am 11. III. 1927 um 11h morgens 0,2 g Guanidinessigsäure i. v.		
5 Minuten nach der Injektion . .	1,39	6,74
15 „ „ „ „ . .	1,56	6,75
30 „ „ „ „ . .	1,64	7,03
45 „ „ „ „ . .	1,53	5,45

Tabelle II (Fortsetzung).

	Präformiertes Blutkreatinin mg	Gesamt-blutkreatinin mg
Am 18. III. 1927 um 9h15′ und 9h45′ morgens je 1 ccm Hypophysenvorderlappenpräparat subkutan,		
um 10h 0,2 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	1,61	7,00
5 Minuten nach der Injektion . .	1,61	6,90
15 „ „ „ „ . .	1,61	6,29
30 „ „ „ „ . .	1,62	5,84
Am 7. IV. 1927 7h abends 30 ccm Rinderserum per os.		
Am 8. IV. 1927 9h morgens 0,2 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	2,30	—
5 Minuten nach der Injektion . .	2,63	—
15 „ „ „ „ . .	2,92	—
30 „ „ „ „ . .	2,72	—

Tabelle III.

Kaninchen, männlich, Gewicht 3780 g.

	Präformiertes Blutkreatinin mg	Gesamt-blutkreatinin mg
Am 19. I. 1927 0,2 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	1,65	6,92
5 Minuten nach der Injektion . .	2,35	8,57
15 „ „ „ „ . .	2,40	6,93
30 „ „ „ „ . .	2,40	6,92
Am 26. I. 1927 Thyreoidektomie.		
Am 7. II. 1927 0,2 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	1,58	5,94
5 Minuten nach der Injektion . .	1,58	5,54
15 „ „ „ „ . .	1,58	5,94
30 „ „ „ „ . .	—	—
Am 15. II. 1927 um 7h30′ abends 25 ccm Menschenblut per os.		
Am 16. II. 1927 um 9h30′ morgens 0,2 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	1,41	7,00
5 Minuten nach der Injektion . .	1,55	7,23
15 „ „ „ „ . .	1,57	7,43
30 „ „ „ „ . .	1,53	6,41
Am 9. III. 1927 um 9h30′ morgens 2 ccm Hypophysin s. c.		
um 10h morgens 0,2 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	1,62	5,54
5 Minuten nach der Injektion . .	1,62	5,54
15 „ „ „ „ . .	1,62	5,54
30 „ „ „ „ . .	1,62	5,46

Tabelle III (Fortsetzung).

	Präformiertes Blutkreatinin mg	Gesamtblutkreatinin mg
Am 13. IV. 1927 um 9h morgens 20 Einheiten Epithelkörperchenextrakt (Original Collip) s. c., beim Eintritt der Blutkalkwirkung 0,2 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	1,82	6,00
5 Minuten nach der Injektion . .	1,82	6,00
15 „ „ „ „ . .	1,82	6,00
30 „ „ „ „ . .	1,82	6,00

Tabelle IV.

Kaninchen, männlich, Gewicht 4000 g.

	Präformiertes Blutkreatinin mg	Gesamtblutkreatinin mg
Am 19. I. 1927 0,2 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	1,43	5,82
5 Minuten nach der Injektion . .	1,56	5,63
15 „ „ „ „ . .	1,94	5,50
30 „ „ „ „ . .	2,30	5,73
Am 26. I. 1927 Thyreoidektomie.		
Am 3. II. 1927 0,2 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	1,64	5,22
5 Minuten nach der Injektion . .	1,64	4,82
15 „ „ „ „ . .	1,64	4,83
30 „ „ „ „ . .	1,64	5,25
Am 17. II. 1927 um 12h 1 ccm Hypophysin s. c., um 12h30' 0,2 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	2,02	5,63
5 Minuten nach der Injektion . .	1,96	5,22
15 „ „ „ „ . .	2,02	5,55
30 „ „ „ „ . .	1,95	5,00
Am 8. III. 1927 um 9h15' morgens 1 ccm Hypophysenvorderlappenpräparat s. c., um 9h45' morgens 0,2 g Guanidinessigsäure.		
Vor der Injektion	1,64	4,86
5 Minuten nach der Injektion . .	1,64	4,25
15 „ „ „ „ . .	1,62	4,25
30 „ „ „ „ . .	1,64	4,25
Am 8. IV. 1927 um 11h morgens 30 ccm Ultrafiltrat von Rinderserum per os., um 5h abends 0,2 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	2,00	— Infolge Autoklavendefekts zu Verlust gekommen
5 Minuten nach der Injektion . .	2,24	—
15 „ „ „ „ . .	2,54	—
30 „ „ „ „ . .	2,17	—

Tabelle IV (Fortsetzung).

	Präformiertes Blutkreatinin mg	Gesamt-blutkreatinin mg
Am 12. V. 1927 um 10h morgens 20 Einheiten Epithelkörperchenextrakt (Original Collip) s. c., nach Eintritt der Blutkalkwirkung 0,2 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	1,59	5,62
5 Minuten nach der Injektion . .	1,59	5,62
15 " " " " . .	1,59	5,62
30 " " " " . .	1,59	5,62

Tabelle V.

Hund, männlich, Gewicht 12 kg.

	Präformiertes Blutkreatinin mg	Gesamt-blutkreatinin mg
Am 21. III. 1927 0,05 g Guanidinessigsäure intravenös.		
Vor der Injektion	1,63	11,68
15 Minuten nach der Injektion . .	2,02	11,69
30 " " " " . .	1,83	13,23
Am 22. III. 1927 Thyreoidektomie.		
Am 24. III. 1927 0,05 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	1,63	6,20
15 Minuten nach der Injektion . .	1,63	5,90
30 " " " " . .	1,63	6,00
Am 1. IV. 1927 um 10h morgens 1 mg Thyroxin (*Henning*) s. c., um 11h morgens 0,05 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	1,22	13,00
15 Minuten nach der Injektion . .	1,26	13,48
30 " " " " . .	1,55	21,42

Tabelle VI.

Katze, männlich, Gewicht 3450 g.

	Präformiertes Blutkreatinin mg	Gesamt-blutkreatinin mg
Am 6. V. 1927 0,05 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	1,61	11,25
15 Minuten nach der Injektion . .	1,72	15,00
30 " " " " . .	2,42	13,48
Am 19. V. 1927 Thyreoidektomie.		
Am 23. V. 1927 0,05 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	1,82	6,43
15 Minuten nach der Injektion . .	1,82	6,00
30 " " " " . .	1,82	6,43

Tabelle VII.

Kaninchen, weiblich, Gewicht 3300 g.

	Präformiertes Blutkreatinin mg	Gesamt-blutkreatinin mg
0,2 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	1,590	6,190
5 Minuten nach der Injektion . .	1,720	6,492
15 „ „ „ „ . .	1,664	6,304
30 „ „ „ „ . .	1,600	5,930
Am 2. IX. 1926 Ovariotomie.		
Am 12. IX. 1926 0,2 g Guanidinessigsäure intravenös.		
Vor der Injektion	1,540	6,070
5 Minuten nach der Injektion . .	1,820	6,382
15 „ „ „ „ . .	1,800	6,081
30 „ „ „ „ . .	1,720	6,000

Tabelle VIII.

Kaninchen, männlich, Gewicht 2250 g.

	Präformiertes Blutkreatinin mg	Gesamt-blutkreatinin mg
0,2 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	1,510	6,000
5 Minuten nach der Injektion . .	1,720	6,498
15 „ „ „ „ . .	1,620	6,170
30 „ „ „ „ . .	1,500	6,080
Am 5. IX. 1926 Kastration.		
Am 15. IX. 1926 0,2 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	1,510	6,010
5 Minuten nach der Injektion . .	1,677	6,560
15 „ „ „ „ . .	1,600	6,380
30 „ „ „ „ . .	1,590	6,090

ausreichten, durchgeführt. Viel wichtiger erschien uns jedoch, vor allem im Hinblick auf unsere Fragstellung, der Nachweis der Methylgruppe selbst. Wir benutzten zuerst das mikroanalytische Verfahren zur Methylimidbestimmung nach *Pregl* und *Lieb*. Wir erhielten jedoch keine einwandfreien Ergebnisse damit, da auch die Kontrollversuche wechselnd positiv und negativ ausfielen. Wir können in dieser Hinsicht die Angaben von *Edlbacher*[1] voll bestätigen. Wir gingen deshalb zu der von ihm angegebenen Modifikation über. Das *Edlbacher*sche Verfahren liefert nun unsrer Erfahrung nach ausgezeichnete, absolut eindeutige Resultate. Bei den letzten Bestimmungen wurden noch die Ratschläge von *Friedrich*[2] berücksichtigt. Da für uns das Fehlen bzw. das Vorhanden-

[1] Zeitschr. f. physiol. Chem. **101**, 1918.
[2] Ebendaselbst **168**, 1927.

sein der Methylgruppen in unseren Versuchen von Wichtigkeit war. so begnügten wir uns mit dem Nachweis der Methylgruppe überhaupt. Nur in einem einzigen Versuch wurde die Bestimmung auch quantitativ durchgeführt. In Kontrollversuchen, sowohl bei verschiedenartigem Futter, als auch im Hunger, erhielten wir mit der *His*schen Methode niemals Niederschläge mit alkoholischer Platinchloridlösung, sondern nur nach Einverleibung von Pyridin. Weitere Einzelheiten können aus den Protokollen der Tabellen IX und XI entnommen werden.

Tabelle IX.

Pyridinversuch zur Darstellung des Pyridylmethylammoniumhydroxyds. Hund, männlich, Gewicht $5^1/_2$ kg.

Verarbeitete Urinmenge ccm	Menge des Platindoppelsalzes der Base mg	Schmelzpunkt des Platindoppelsalzes der Base °	Platingehalt %	Methylgruppenbestimmung nach *Edlbacher*
Am 20., 21. und 22. XI. 1926 je 1 g Pyridinsulfat s. c.				
2000	207	207	32,3	positiv
Am 8. XII. 1926 Thyreoidektomie.				
Am 14., 15. und 16. XII. 1926 je 1 g Pyridinsulfat s. c.				
2000	40	207	32,5	positiv
Am 13., 14. und 15. I. 1927 je 1 g Pyridinsulfat s. c.				
1500	75,2	—	—	positiv
Am 18., 19. und 20. II. 1927 nach 48stündigem Hunger je 1 g Pyridinsulfat s. c.				
1800	60	208	33,0	positiv quantitativ
Am 24., 26. und 27. II. 1927 (Hungerversuch) je 1 g Pyridinsulfat s. c.				
1000	53	—	32,6	positiv

Tabelle X.

Pyridinversuch zur Darstellung des Pyridylmethylammoniumhydroxyds. Hund, männlich, Gewicht 5 kg.

Verarbeitete Urinmenge ccm	Menge des Platindoppelsalzes der Base mg	Schmelzpunkt des Platindoppelsalzes der Base °	Platingehalt %	Methylgruppenbestimmung nach *Edlbacher*
Am 7., 8. und 9. III. 1927 je 1 g Pyridinsulfat s. c.				
1800	108	206	32,6	positiv
Am 29. III. 1927 Thyreoidektomie.				
Am 2., 3. und 4. IV. 1927 je 1 g Pyridinsulfat s. c.				
700	20	—	—	positiv
Am 14. IV. 1927 Kastration.				
Am 1., 2. und 3. V. 1927 je 1 g Pyridinsulfut s. c.				
800	25	—	—	positiv

Tabelle XI.

Kombinierter Pyridin- und Guanidinessigsäureversuch nach Hypophysen- und Thyreoideaexstirpation.

Junger Hund, weiblich. Gewicht 2 kg.

	Präformiertes Blutkreatinin mg	Gesamtblutkreatinin mg
Am 20. IV. 1927 0,025 g Guanidinessigsäure i. v.		
Vor der Injektion	1,03	3,15
5 Minuten nach der Injektion . .	1,11	3,40
15 „ „ „ „ . .	1,28	3,46

Am 20., 21. und 22. IV. 1927 je 0,5 g Pyridinsulfat s. c.

Verarbeitete Urinmenge ccm	Menge des Platindoppelsalzes der Base mg	Schmelzpunkt des Platindoppelsalzes der Base °	Platingehalt %	Methylgruppenbestimmung nach *Edlbacher*
600	70	206	32,6	positiv
Am 9. V. 1927 wurde die Exstirpation der Hypophysis ausgeführt[1].				
Am 14., 15. und 16. V. 1927 wird je 0,5 g Pyridinsulfat s. c. gegeben.				
1300	10	—	—	positiv

Am 21. V. 1927 wird 0,025 g Guanidinessigsäure i. v. gegeben.

	Präformiertes Blutkreatinin mg	Gesamtblutkreatinin mg
Vor der Injektion	1,13	6,29
5 Minuten nach der Injektion	1,48	6,66
15 „ „ „ „	1,46	6,16

Danach wird am 21. V. 1927 die Thyreoidektomie durchgeführt.

Am 22., 23. und 24. V. 1927 wird je 0,5 g Pyridinsulfat s. c. gegeben.

Verarbeitete Urinmenge ccm	Menge des Platindoppelsalzes der Base mg	Schmelzpunkt des Platindoppelsalzes der Base °	Platingehalt %	Methylgruppenbestimmung nach *Edlbacher*
250	32	207	32,6	positiv

Am 25. V. 1927 wird 0,025 g Guanidinessigsäure i. v. verabfolgt.

	Präformiertes Blutkreatinin mg	Gesamtblutkreatinin mg
Vor der Injektion	1,20	6,67
5 Minuten nach der Injektion	1,20	6,67
„ „ „ „	1,20	6,67

[1] Die Operation wurde von Herrn Dr. *Sato* nach der von ihm im hiesigen rnakologischen Institut ausgebildeten Methode vorgenommen. Wir ihm dafür zu besonderem Danke verpflichtet.

Die Versuche (Tabelle IX bis XI) zeigen, daß nach Entfernung der Schilddrüse die Menge des ausgeschiedenen Platinsalzes zurückgeht, daß aber die Methylierung des Pyridins trotzdem vor sich geht, daß sie also völlig *unabhängig* von der Funktion der Schilddrüse verläuft, im Gegensatz zur Methylierung der Guanidinessigsäure. Auch die *Entfernung* der *Hypophysis* ist ohne Einfluß auf die Pyridinmethylierung (Tabelle XI), desgleichen die Kastration (Tabelle X). Sie läuft auch ungestört weiter, wenn man bei dem Tiere nach Erholung von dem Hypophysiseingriff noch die *Schilddrüse* entfernt.

In diesem Versuche wurde außer der Pyridinmethylierung auch noch die Methylierung der Guanidinessigsäure geprüft. Während auch hier die *Hypophysisexstirpation ohne* jeden Einfluß ist, fällt nach *Entfernung* der *Schilddrüse*, wie aus den früheren Versuchen zu erwarten war, die *Guanidinessigsäuremethylierung völlig weg*, während die des *Pyridins erhalten bleibt*. Die *Methylierung* des *Pyridins* scheint also *unabhängig* von der Funktion der innersekretorischen Drüsen zu verlaufen, wie schon aus den Experimenten *Tomitas* hervorgeht, welche die diesbezügliche Bedeutung der Leber hervorheben. Ganz anders verhält es sich mit der *Methylierung* der *Guanidinessigsäure*, für sie ist die *Intaktheit* der *Schilddrüsenfunktion* unbedingt erforderlich. Die vorstehenden Versuche bestätigen erneut unsere früheren Untersuchungen und erweitern sie dahin, daß diese Befunde nicht nur für das Kaninchen, sondern auch für den Hund und die Katze Gültigkeit haben. Außerdem zeigen sie, daß es sich um eine ganz *spezifische* Einstellung der Schilddrüse gegenüber der Guanidinessigsäure handelt. Nur *diese* Drüse ist befähigt, diese Methylierung durchzuführen, und andererseits beschränkt sich diese Leistung der Schilddrüse anscheinend auf die Guanidinessigsäure. In dieser Hinsicht sind Untersuchungen von *Flössner*[1] von besonderem Interesse. Er konnte in Schweineovarien das Vorkommen von freien Purinbasen nachweisen. Vor allem fällt das reichliche Vorhandensein von Paraxanthin auf. *Flössner* vermutet mit guten Gründen eine endogene Purinbildung im Ovarium, die im Falle des Paraxanthins eine Methylierung zur Bedingung hat. Auch das von *Flössner* nachgewiesene Vorhandensein methylierter Amine, vor allem in besonders reichlicher Menge des Neosins, ist bemerkenswert. *Flössner* denkt mit Recht an Beziehungen dieser methylierten Produkte zur inneren Sekretion des Ovariums. Es erscheint uns außer Frage, und wir befinden uns diesbezüglich in Übereinstimmung mit den Ansichten *Flössners*, daß diesen Methylierungsvorgängen eine

[1] Zeitschr. f. Biol. **86**, 1927.

besondere biologische Bedeutung zukommt, um so mehr, als nach *Flössner* und unseren eigenen Untersuchungen ein Teil dieser intermediären chemischen Prozesse an die Funktion von zwei biologisch hochwertigen Drüsen mit innerer Sekretion geknüpft ist.

Zusammenfassend können wir also sagen: Die *Methylierung* der *Guanidinessigsäure* zu Kreatin ist bei Hunden, Kaninchen und Katzen eine *spezifische* Funktion der *Schilddrüse.* Hypophysis und Keimdrüsen kommt diese Fähigkeit nicht zu. Die Methylierung des Pyridins dagegen verläuft bei Hunden völlig *unabhängig* von der Tätigkeit der erwähnten Drüsen mit innerer Sekretion.

Untersuchungen zur Lehre von der Blutgerinnung.

XVI. Mitteilung:

Über die Glykolyse in künstlichen Gerinnungsgemischen (Fibrinogen + Thrombin).

Von

Bernhard Stuber und **Konrad Lang.**

(Aus der medizinischen Klinik zu Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 25. Oktober 1927.)

In unserer vorhergehenden Mitteilung[1] haben wir die Beziehungen der *Blutglykolyse* zur *Blutgerinnung* klargelegt. Es konnte die *Abhängigkeit* des Gerinnungsablaufes von den bei dem Zuckerabbau sich bildenden Säuren gezeigt und vor allem auf die Bedeutung der *anaeroben* und *aeroben Phase* der *Zuckerzerstörung*, unter spezieller Berücksichtigung der gerinnungshemmenden Mittel, hingewiesen werden. In zwingender Weise ergaben sich aus diesen experimentellen Befunden neuartige Vorstellungen über das *Wesen* des Gerinnungsprozesses. Der Kürze halber greifen wir heute auf diese Fragen nicht weiter zurück, und verweisen diesbezüglich auf die erwähnte frühere Arbeit von uns.

Hatten wir in diesen früheren Untersuchungen die Glykolyse unter möglichst *natürlichen* Bedingungen, also am gerinnenden Gesamtblut bzw. Plasma bestimmt, so schien es uns jetzt von Interesse, die Glykolyse auch in künstlichen Gerinnungsmischungen kennenzulernen. Zu solchen zählt fraglos die Fibrinogen-Thrombingerinnung. Über diese Versuche soll im folgenden berichtet werden.

Das Fibrinogen wurde nach der Methode von *Hammarsten* aus Pferdeblut, das Thrombin nach den Angaben von *Alexander Schmidt* dargestellt. Die Zuckerbestimmungen wurden nach *Hagedorn-Jensen*, die Milchsäurebestimmungen nach *Mendel-Goldscheider* durchgeführt. Es wurde immer zu 1 ccm Fibrinogen 1 ccm der Thrombinlösung zugesetzt. In den Versuchen, in denen als Thrombin Serum verwandt wurde, betrug die Menge des letzteren 2 ccm. Außerdem wurde noch zum Vergleich altes Serum, das keine Gerinnung mehr in Fibrinogenlösungen auslöste, in denselben Mengenverhältnissen benutzt. Die Zucker- und Milchsäure-

[1] Diese Zeitschr. 179, 70, 1926.

bestimmungen wurden immer sofort nach Mischung der Fibrinogen-Thrombinlösung und dann beim Eintritt der Gerinnung vorgenommen. Bei Verwendung von altem, unwirksamem Serum wurden die Bestimmungen ebenfalls sofort nach Mischung der Lösungen und außerdem nach 30 bzw. 60 Minuten durchgeführt.

Tabelle I.

Glykolyse während der Fibrinogen-Thrombingerinnung.

	Zucker vor der Gerinnung %	Zucker im Beginn der Gerinnung %
1	0,018	0,013
2	0,010	0,013

Da die Zuckerwerte des Fibrinogen-Thrombingemisches sehr niedrige waren, wie aus Tabelle I ersichtlich, und dadurch die den angewandten Mikromethoden anhaftenden Fehlerquellen relativ groß wurden, so führten wir noch Versuche unter Zugabe von Glucose durch. Die verwandten Mengen ergeben sich aus den Analysen.

Tabelle II.

Glykolyse während der Fibrinogen-Thrombingerinnung unter Zugabe von Glucose.

	Zucker vor der Gerinnung %	Zucker im Beginn der Gerinnung %	Milchsäure vor der Gerinnung mg-%	Milchsäure im Beginn der Gerinnung mg-%
1	0,191	0,194	—	—
2	0,188	0,182	—	—
3	0,040	0,040	3,0	3,0
4	0,036	0,035	2,0	2,0
5	0,020	0,022	0,0	0,0
6	0,106	0,107	0,0	0,0

Tabelle III.

	Gerinnungszeit Min.	Zucker vor der Gerinnung %	Zucker im Beginn der Gerinnung %	Milchsäure vor der Gerinnung mg-%	Milchsäure im Beginn der Gerinnung mg-%	Art des Serums
Glykolyse während der Fibrinogen-Thrombingerinnung. Als Thrombin diente frisches Serum.						
1	42	0,085	0,082	18	19	Hundeserum
2	3	0,091	0,084	9	11	Menschl. Serum
3	2	0,066	0,059	14	16	„ „
4	35	0,098	0,088	10	14	„ „
Glykolyse während der Fibrinogen-Serumgerinnung unter Zugabe von Glucose.						
5	44	0,162	0,154	26	29	Hundeserum
6	4	0,161	0,153	9	12	Menschl. Serum
7	4	0,191	0,188	14	16	„ „
8	43	—	—	11	13	„ „

Tabelle IV.

	Versuchsdauer Min.	Zucker im Beginn des Versuchs %	Zucker am Ende des Versuchs %	Milchsäure im Beginn des Versuchs mg·%	Milchsäure am Ende des Versuchs mg·%
Glykolyse im Fibrinogen-Serumgemisch. Das verwandte Serum war alt und dementsprechend unwirksam, so daß keine Gerinnung eintrat.					
1	30	0,032	0,029	—	—
2	60	0,022	0,020	20	20
Derselbe Versuch unter Zugabe von Glucose.					
3	30	0,117	0,117	—	—
4	60	0,140	0,142	20	20

Die Versuche zeigen, daß während der Fibrinogen-Thrombingerinnung bei Verwendung des *Alexander Schmidtschen Thrombins* (Tabelle II) *eine Glykolyse*, vor allem unter Berücksichtigung der Milchsäurewerte, *nicht* nachweisbar ist. Genau dasselbe Ergebnis ist aus den Versuchen der Tabelle IV zu entnehmen, in denen an Stelle des *Schmidt*schen Thrombins *altes* unwirksames Serum angewandt wurde, und dementsprechend gar keine Gerinnung eintrat. Die Glykolyse bleibt hier, auch unter Zugabe von Glucose, völlig aus.

Wesentlich andere Resultate ergeben die Gerinnungsversuche, in denen als Thrombin *frisches*, gut wirksames Serum gebraucht wurde (Tabelle III). Hier sehen wir *regelmäßig* eine *deutliche Glykolyse* während des Gerinnungsprozesses ablaufen, wenn auch nicht so stark, wie in den Versuchen am Vollblut unserer früheren Mitteilung. Betrachtet man die zeitlichen Verhältnisse der Fibrinogen-Serumgerinnung im Verhältnis zur Stärke der Glykolyse, so ergibt sich, daß die *Glykolyse* um so *rascher verläuft*, je *kürzer* die *Gerinnungszeit* ist. Es besteht unverkennbar zwischen *Gerinnungsablauf* und *Geschwindigkeit* der *Zuckerzerstörung* eine *Proportionalität.*

Es ergibt sich also aus diesen Versuchen unter Berücksichtigung der Glykolyse eine auffallende *Divergenz* zwischen der Gerinnungsauslösung in Fibrinogenlösungen durch das *Alexander Schmidtsche Thrombin* einerseits und durch *frisches Serum* andererseits. Die Gerinnung durch das *Schmidt*sche Thrombin verläuft *ohne* Glykolyse. Genau *dasselbe* Verhalten zeigt unter zeitlich gleichen Verhältnissen *altes unwirksames Serum*, das in Fibrinogenlösung gar keine Gerinnung mehr auslöst. Dagegen ist die Fibrinogengerinnung durch *frisches*, stark wirksames Serum *immer* mit einer *deutlichen Glykolyse* verknüpft, und zwar sind Gerinnungszeit und Geschwindigkeit der Glykolyse einander *proportional*. Die Verhältnisse liegen im letzteren Falle ähnlich, wie bei der Gerinnung des nativen Blutes bzw. Plasmas. Damit ist ein neuer Beweis erbracht, daß die gerinnungsauslösenden Faktoren

des *Alexander Schmidtschen Thrombins ganz anderer Natur* sind, als diejenigen der *natürlichen*, spontan gerinnenden Flüssigkeiten. Wir werden dadurch weiterhin in unserer schon in früheren Arbeiten experimentell fundierten Anschauung bekräftigt, daß das *Alexander Schmidtsche Thrombin* mit dem *natürlichen Gerinnungsvorgang nichts* zu tun hat, daß es ein *Kunstprodukt* ist ohne biologische Bedeutung.

Zusammenfassung.

Während bei der Fibrinogen-Serumgerinnung, ähnlich wie der spontanen Gerinnung des Gesamtblutes bzw. Plasmas, eine *deutliche Glykolyse* auftritt, deren Geschwindigkeit *proportional* der Gerinnungszeit ist, läßt die Fibrinogengerinnung durch das *Alexander Schmidtsche Thrombin jede Glykolyse vermissen.* Der natürliche Gerinnungsvorgang und ebenso die Fibrinogen-Serumgerinnung sind also unter Berücksichtigung der Glykolyse von der Fibrinogengerinnung durch das *Schmidt*sche Thrombin *prinzipiell verschieden.* Darin wird ein weiterer Beweis für die *artifizielle Natur* des *Alexander Schmidtschen Thrombins* erblickt.

Untersuchungen zur Lehre von der Blutgerinnung.

XVII. Mitteilung:

Über die p_H-Verschiebung während des Gerinnungsprozesses.

Von

Bernhard Stuber und **Konrad Lang.**

(Aus der medizinischen Klinik zu Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 25. Oktober 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In unserer vorletzten Mitteilung[1] haben wir auf die Untersuchungen von *Kugelmass* hingewiesen und dessen Angaben über die *Abnahme* der *H˙-Ionenkonzentration* während des *Gerinnungsprozesses* bestätigen können. Wir konnten fernerhin zeigen, daß die p_H-Kurve des *Oxalatplasmas* zunächst abfällt, also eine p_H-Verschiebung nach der *sauren* Seite eintritt, daß jedoch im Moment der *Rekalzifizierung* des Oxalatplasmas die p_H-Kurve sofort den *entgegengesetzten* Verlauf nimmt, also im gerinnenden Oxalatplasma *dieselbe* Verminderung der H˙-Ionenkonzentration auftritt, wie bei der Gerinnung des Gesamtblutes.

Es war für uns nun von Interesse, weiterhin die Frage zu entscheiden, ob diese H˙-Ionenadsorption während des Gerinnungsprozesses ein für die Blutgerinnung *spezifischer* Vorgang ist, oder ob er sich ebenso in anderen Gerinnungssystemen nachweisen läßt. Zugleich schien es uns auch erwünscht, die Veränderung der H˙-Ionenkonzentration noch mit einer anderen, als der damals von uns verwandten Methode, dem Potentiometer von *Mislowitzer* und der Chinhydronelektrode, zu messen, da ihre Zuverlässigkeit nach neueren Untersuchungen doch an einen beschränkten p_H-Bereich gebunden zu sein scheint.

---

[1] Diese Zeitschr. **179**, 70, 1926.

Wir benutzten deshalb für die folgenden Untersuchungen die Methode der Gaskettenmessung in der Anordnung nach *Michaelis*. Als Bezugselektrode diente die gesättigte Kalomelelektrode, als Meßelektrode die Wasserstoffelektrode. Wir bemerken noch, daß die Platinelektroden nach jedem Versuch frisch platiniert wurden. Da wir zum Studium der H'-Ionenverschiebung während des Gerinnungsprozesses vor allem auch künstliche Gerinnungsgemische, z. B. Fibrinogen-Thrombin, heranziehen wollten, so war die übliche Form der Meßelektrode nicht brauchbar. Bei Verwendung einer derartigen Elektrode mußten beide Gerinnungsfaktoren, Gerinungssubstrat und gerinnungauslösendes Agens, schon zu Beginn miteinander

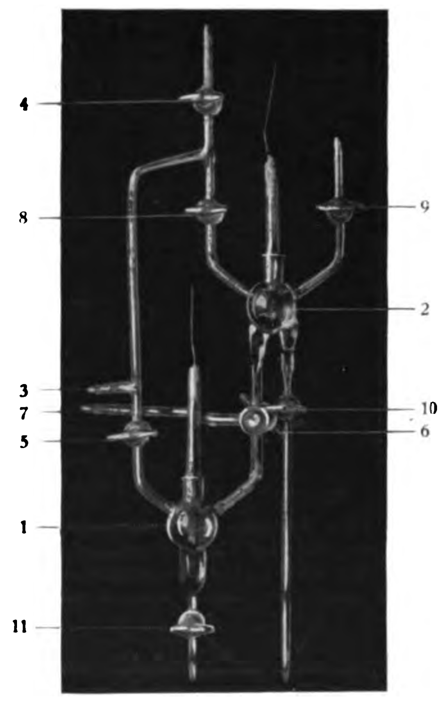


Abb. 1.

gemischt in die Elektrode gegeben werden, und dann erst konnte die Sättigung mit strömendem Wasserstoffgas erfolgen. Da letztere mehrere Minuten in Anspruch nimmt, so war in der Zwischenzeit die Gerinnung schon im Gange, so daß eine Messung, die den ganzen Bereich des Gerinnungsvorganges umfaßte, nicht mehr möglich war. Wir konstruierten uns deshalb eine Doppelelektrode, die es gestattete, zunächst das Potential von jedem Faktor des Gerinnungssystems für sich allein festzustellen und dann ohne Änderung der Wasserstoffatmosphäre beide zur Herbeiführung der Gerinnung zu vereinen und damit vom Beginn der Gerinnung an eine fortlaufende Messung zu ermöglichen. Aus der Abb. 1 ergibt sich die Konstruktion der Doppelelektrode.

Tabelle I.

Fibrinogen-Thrombingerinnung. Fibrinogen nach *Hammarsten*, Thrombin nach *Alexander Schmidt*, je 2 ccm.

Zeit	Versuch								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Minuten	p_H	p_H	p_H	p_H	p_H	p_H	p_H	p_H	p_H
0	—	6,73	8,54	7,11	6,92	8,83	7,55	7,54	8,17
2	—	6,77	8,59	7,41 *	7,06	8,83	7,73	7,68	8,28
4	—	6,81	8,66 *	7,61	7,09	8,83	7,89	7,78	8,52 *
6	6,70	6,96	8,71	7,91	7,34	8,85	8,07	7,91	8,54
8	6,89	7,01	8,76	7,95	7,31	8,85	8,24	8,09	8,54
10	7,00	7,03	Gerin-	Gerin-	7,37	8,88	8,38	8,26	8,56
12	7,03	7,03	nung	nung	7,35	8,94 *	8,44	8,44	8,58
14	7,08	Gerin-			7,35	8,94	8,46	8,52 *	8,59
16	7,11	nung			7,35	8,94	8,46 *	8,59	8,59
18	7,17				Gerin-	8,94	8,44	8,62	8,59
20	7,21				nung	8,94	8,44	8,62	8,59
22	7,22					8,93	8,44	8,64	8,59
24	7,23					8,93	Gerin-	8,64	8,59
26	Gerin-					8,93	nung	8,64	8,59
28	nung					8,93		8,64	Gerin-
30						8,93		8,64	nung
32						8,93		8,66	
34						8,93		8,61	
36						8,93		8,61	
38						8,93		Gerin-	
40						8,93		nung	
42						8,93			
						Gerin-			
						nung			

Bei * feine Gerinnsel an der Elektrode. Die Untersuchungen wurden an verschiedenen Tagen durchgeführt, dementsprechend sind für die verschiedenen Versuche die Thrombinlösungen immer frisch dargestellt worden. Das Thrombin stammte meist aus Menschenserum, in einzelnen Versuchen wurde auch Hunde-, Kaninchen- und Pferdeserum verwandt.

Die beiden kugeligen, nach unten zu sich verjüngenden Elektrodengefäße (1 und 2) haben ein Fassungsvermögen von etwa 5 ccm, sie tragen an ihrem oberen Ende eingeschliffen eine Glasröhre mit der Platinelektrode. Der weitere Bau der Doppelelektrode erklärt sich am besten durch Schilderung einer Versuchsausführung. In das Elektrodengefäß 1 werden 1 bis 2 ccm Fibrinogen, in das Elektrodengefäß 2 dieselbe Menge des gerinnungsauslösenden Agens, z. B. Thrombinlösung, eingefüllt. Dann werden sämtliche Hähne geschlossen. Nun wird an das Mundstück 3 der Wasserstoffapparat angeschlossen, Hahn 4 geöffnet und dieser Teil des Elektrodensystems mit Wasserstoffgas gefüllt. Nach Schließen von Hahn 4, werden Hahn 5 und 6 geöffnet, und dadurch die mit Fibrinogenlösung beschickte Elektrode 1 mit Wasserstoff gesättigt. Hahn 6 ist ein Dreiwegehahn (in der Abbildung von der Rückseite gesehen), der einerseits die Verbindung mit Elektrode 2, andererseits die Kommunikation mit dem frei endenden Glasrohr 7 ermöglicht. Bei der Wasserstoffdurchleitung durch Elektrode 1 wird Hahn 6 so gestellt, daß das Wasserstoffgas bei 7 entweichen kann.

Tabelle II.

Fibrinogen-Thrombingerinnung in mit Phosphatgemisch gepufferter Lösung, Mengen wie Tabelle I.

Zeit	Versuch			
	1	2	3	4
Minuten	p_H	p_H	p_H	p_H
0	7,44	7,48	6,98	7,00
2	7,44 *	7,48	7,00	7,02
4	7,44	7,48 *	7,00	7,02
6	7,46	7,49	7,00	7,02
8	7,46	7,49	7,00	7,02
10	7,46	7,49	7,00	7,02
12	7,46	7,49	7,00	7,02
14	7,46	7,49	7,00	7,02
16	7,46	7,49	7,00	7,02
18	7,46	7,49	7,00	7,02
20	7,48	7,49	7,00	7,02
22	7,48	7,49	7,00	7,04
24	7,48	7,49	7,00	7,04
26	7,48	7,49	7,02	7,04
28	7,48	7,49	7,02	7,04
30	7,48	7,49	7,02	7,04
32	7,48	7,49	7,02	7,04
34	7,48	7,49	7,02	7,04
36	7,48	7,49	7,02	7,04
38	7,48	7,49	7,02	Gerinnung
40	7,48	7,49	7,02	
42	7,48	7,49	7,02	
44	7,49	7,49	Gerinnung	
46	7,49	Geriunung		
	Gerinnung			

Bei * feine Gerinnsel an der Elektrode. Das Thrombin, nach *Alexander Schmidt* dargestellt, wurde für die einzelnen Versuche in Phosphatgemischen von verschiedenem p_H (s. Tabelle) gelöst.

Die Wasserstoffsättigung erfolgte in der Weise, daß nach Durchleiten von etwa 5 Minuten und nach Schließung sämtlicher Hähne die Elektrode 60mal geschüttelt wurde, dann wurde erneut Wasserstoff zugeführt. Dieses Verfahren wurde dreimal vorgenommen. In derselben Weise wurde die Elektrode 2 mit Wasserstoffgas gesättigt, indem dasselbe von 3 aus bei geöffneten Hähnen 8 und 9 die Elektrode durchströmte. Dadurch konnte nun zunächst das Potential beider Lösungen in Elektrode 1 und 2 getrennt nacheinander festgestellt werden. Die Enden der beiden Elektroden tauchen in die gesättigte KCl-Lösung. Durch Öffnen der Hähne 10 bzw. 11 konnte die Messung sofort erfolgen. Darnach wurde durch geeignete Stellung des Dreiwegehahns 6 die Verbindung zwischen Elektrode 1 und 2 hergestellt und durch einen leichten Wasserstoffstrom von 9 aus die gerinnungsauslösende Flüssigkeit der Elektrode 2 in die Fibrinogenlösung der Elektrode 1 übergeführt. Durch Öffnen von Hahn 11 konnte sofort die Messung vorgenommen und in beliebigen zeitlichen Zwischenräumen, meist in Pausen von 2 Minuten, das Potential während des Gerinnungsvorgangs festgestellt werden.

Tabelle III.

Fibrinogen-Serumgerinnung.

Zeit Minuten	Versuch 1 p_H	2 p_H	3 p_H	4 p_H
0	8,13	7,53	8,18	8,08
2	8,15	7,53	8,18	8,10
4	8,15	7,53	8,18	8,12
6	8,16	7,53	8,20	8,12
8	8,16	7,55	8,20	8,12
10	8,16	7,55	8,20	8,12
12	8,16	7,55	Gerinnung	8,12
14	8,16 *	7,57		8,12
16	8,16	7,57		8,12
18	8,17	7,57		8,12
20	8,17	7,57		Gerinnung
22	8,17	7,58		
24	8,17	7,58		
26	8,18	7,58		
28	8,18	7,60		
30	8,18	7,60		
32	8,18	7,60		
34	8,18	7,60		
36	8,18	7,60		
38	8,18	7,62		
40	8,18	7,62		
42	8,18	7,62		
44	Gerinnung	7,62		
46		7,62		
48		Gerinnung		

Bei * feine Gerinnsel an der Elektrode. Das Serum stammte vom Menschen.

Wir ermittelten nun die p_H-Verschiebung in verschiedenen Gerinnungsgemischen. Als solche dienten uns: Fibrinogen + Thrombin, Fibrinogen + Thrombin in gepufferter Lösung, Fibrinogen + Serum, rekalzifiziertes Oxalatplasma, NaCl-Salzplasma und schließlich die Milchgerinnung durch Lab.

Wie aus Tabelle I zu entnehmen ist, tritt während der Fibrinogen-Thrombingerinnung eine sehr starke Abnahme der $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration, also eine Verschiebung nach der alkalischen Seite zu, ein. Die Gerinnung verläuft aber auch im gepufferten Milieu (Tabelle II). Selbstverständlich kommt hier die Verschiebung nicht so deutlich zum Ausdruck infolge der Maskierung durch den Puffer.

In Tabelle III wurde an Stelle des *Alexander Schmidt*schen Thrombins frisches Serum zur Auslösung der Fibrinogengerinnung verwandt. Die Ergebnisse sind dieselben, wie bei der Thrombingerinnung.

Die Tabellen IV und V orientieren über die Änderung der $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration während der Gerinnung des rekalzifizierten Oxalat-

Tabelle IV.

Gerinnung von Oxalatplasma (4°/$_{00}$) durch Zusatz von 5% $CaCl_2$-Lösung.

Zeit	Versuch			
	1	2	3	4
Minuten	p_H	p_H	p_H	p_H
0	7,59	7,67	7,46	7,90
2	7,62	7,74	7,46	7,97
4	7,62	7,74	7,47	7,99
6	7,62	7,75	7,49	7,99
8	7,62	7,75	7,53	7,99
10	7,64	7,75	7,55	7,97
12	7,66	7,77	7,55	Gerinnung
14	7,67	7,77	7,55	
16	7,67	7,79	7,57	
18	7,67	7,79	7,57	
20	7,67 *	7,79	7,59	
22	7,69	7,79	7,59	
24	7,69	7,79	7,60	
26	7,69	7,79	7,60	
28	7,69	7,79	7,60	
30	Gerinnung	7,79	7,60	
32		7,77	7,60	
34		7,77	7,60	
36		7,77	7,60	
38		7,79	7,60	
40		7,79	7,60	
42		7,79	7,60	
44		Gerinnung	7,60	
			Gerinnung	

Bei * feines Gerinnsel an der Elektrode. Die Menge des Oxalatplasmas betrug in jedem Versuch 2 ccm. Die optimale Kalkmenge wurde vorher festgestellt und in die Elektrode 2 eingeführt, die in ihrem unteren Teile, der die Verbindung mit Elektrode 1, in der sich das Oxalatplasma befand, herstellt, eine Mensurierung trug. Als Plasma diente solches vom Menschen.

plasmas und der Spontangerinnung des optimal verdünnten Kochsalzplasmas. Auch hier finden wir übereinstimmend eine deutliche Zunahme des p_H.

Schließlich zeigt uns die Tabelle VI die Ergebnisse bei der Milchgerinnung durch das Labferment. Auch hier stoßen wir auf denselben Verlauf der p_H-Kurve, wie in den zuerst geschilderten Gerinnungsversuchen.

Diese Untersuchungen bestätigen also die Angaben unserer früheren Mitteilung und übertragen sie auf die *verschiedensten* Gerinnungssysteme. Es tritt *ganz allgemein* während des Gerinnungsprozesses, gleichgültig welche Gerinnungsfaktoren aufeinander einwirken, im Sinne von *Kugelmass* eine *Adsorption von H˙-Ionen* an die flockenden Eiweißkörper ein. Diese Adsorption drückt sich in einer Abnahme der H˙-Ionenkonzentration des Gerinnungsmilieus aus, die p_H-Kurve

Tabelle V.

Spontangerinnung von NaCl-Plasma durch Verdünnung.

Zeit	Versuch			
	1	2	3	4
Minuten	p_H	p_H	p_H	p_H
0	8,41	8,49	8,37	8,70
2	8,43	8,49	8,37	8,72
4	8,45	8,49	8,39	8,74
6	8,45	8,51	8,39	8,74
8	8,45	8,51	8,39	8,74
10	8,43	8,51	8,39	8,74
12	8,43	8,51	8,39	8,74
14	8,43	8,51	8,39	8,74
16	Gerinnung	8,51	8,39	8,74
18		8,51	8,39	8,74
20		8,51	Gerinnung	8,74
22		8,51		8,74
24		8,51		8,74
26		8,51		8,74
28		8,51		8,74
30		8,51		8,74
32		8,51		8,74
34		Gerinnung		8,74
36				8,74
38				8,74
40				8,74
42				8,74
44				Gerinnung

Das Plasma stammte vom Menschen.

steigt also nach der alkalischen Seite hin an. Es ist also diese p_H-Verschiebung *nicht* etwa ein für die Blutgerinnung *spezifischer* Vorgang, sie zeigt sich vielmehr genau so bei der Milchgerinnung und scheint *allen flockenden Systemen eigen zu sein.*

Zusammenfassung.

Es wird die Änderung der $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration in verschiedenen Gerinnungssystemen mittels der Gaskette in der Anordnung von *Michaelis* bestimmt. Durch die Konstruktion einer Doppelelektrode wird die p_H-Messung vom *Beginn* der Gerinnung an in kurzen Zwischenräumen ermöglicht. Es konnte in den verschiedensten Gerinnungsgemischen ganz allgemein eine Abnahme der $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration während des Gerinnungsprozesses nachgewiesen werden. Diese p_H-Verschiebung nach der alkalischen Seite tritt auch während der Milchgerinnung auf, sie ist also *nicht spezifisch* für die Blutgerinnung. Sie scheint vielmehr ein *obligater Vorgang* in *allen Gerinnungssystemen* zu sein.

Tabelle VI.

Milchgerinnung durch Lab (Präparat *Merck* 1: 100000).

Zeit	Versuch			
	1	2	3	4
Minuten	p_H	p_H	p_H	p_H
0	6,61	6,60	6,39	6,41
2	6,65	6,60	6,39	6,41
4	6,65	6,60	6,41	6,41
6	6,65	6,62	6,41	6,43
8	6,65	6,62	6,41	6,43
10	6,65	6,62	6,41	6,45
12	6,66	6,64	6,41	6,45
14	6,66	6,64	6,41	6,45
16	6,66	6,64	6,41	6,45
18	6,66	Gerinnung	6,41	6,45
20	Gerinnung		6,41	6,45
22			6,41	6,45
24			6,41	6,45
26			6,41	6,45
28			6,43	6,45
30			6,43	6,45
32			6,43	6,45
34			6,43	6,45
36			6,43	6,45
38			Gerinnung	6,45
40				6,45
				Gerinnung

Untersuchungen zur Lehre von der Blutgerinnung.

XVIII. Mitteilung:

Über den Einfluß der Hypo- und Hyperkapnie auf die Blutgerinnung.

Von

Bernhard Stuber und **Konrad Lang.**

(Aus der Medizinischen Klinik zu Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 25. Oktober 1927.)

Nachdem wir in unseren früheren Untersuchungen[1] die *ursächliche* Bedeutung der *Blutglykolyse* für den Gerinnungsprozeß nachgewiesen hatten, war es naheliegend, die Frage zu prüfen, inwieweit experimentell bedingte Änderungen im Ablauf der Blutglykolyse den Gerinnungsvorgang zu beeinflussen vermögen. Wenn einerseits auch zu erwarten war, daß derartige Abweichungen vom physiologischen Geschehen nur durch extrem gestellte experimentelle Bedingungen zu erreichen sein würden, so durften andererseits diese Eingriffe auch nicht das Leben der Versuchstiere gefährden. Unter diesen Gesichtspunkten schienen uns zwei Wege zur experimentellen Beantwortung zu führen. Nach den Angaben der Literatur liegt das Optimum der Blutglykolyse bei einem p_H von 7,5 bis 8,0. Eine *Hypokapnie* und damit eine Verschiebung der Blutreaktion nach der *alkalischen* Seite glaubten wir am einfachsten durch längere *Überventilation* zu erreichen. Die andere Möglichkeit zur experimentellen Klarstellung der aufgeworfenen Frage erblickten wir in der entgegengesetzten Richtung, in der *Kohlensäureanreicherung* des Blutes unter Vermeidung zu starker Blutsäuerung. Um eine derartige *Hyperkapnie* herbeizuführen, ließen wir die Tiere über längere Zeit hin ein kohlensäurereiches Luftgemisch von bestimmtem Prozentgehalt an CO_2 einatmen.

Als Versuchstiere benutzten wir Hunde. Dieselben wurden in Somnifennarkose tracheotomiert und mit dem *H. Meyer*schen Atmungsapparat verbunden. Das Blut wurde aus der Schenkelarterie entnommen. Die Zucker- und Milchsäurebestimmungen im Blute wurden nach *Hagedorn-Jensen* bzw. nach *Mendel-Goldscheider* durchgeführt, und zwar direkt nach Ent-

[1] Diese Zeitschr. 179, 70, 1926.

nahme des Blutes und 5 Minuten später, also während des Gerinnungsprozesses. Trat die Gerinnung früher ein, so wurden die Bestimmungen im Beginn der Gerinnung vorgenommen. Die Feststellung der Gerinnungszeit erfolgte mit dem Apparat von *Heubner* und *Rona*[1] bei 37° C. Außerdem wurden die quantitativen Änderungen der korpuskulären Blutelemente nach den üblichen Methoden festgestellt. Die Zählung der Thrombocyten wurde nach dem in neuester Zeit von *F. B. Hofmann*[2] und dessen Schüler *Flössner*[3] angegebenen Verfahren durchgeführt. Die Größe der Überventilation, ebenso der CO_2-Gehalt der Atmungsgemische und die Dauer der einzelnen Versuche sind aus den Protokollen der Tabellen I und II ersichtlich. Sämtliche Bestimmungen wurden in halbstündigen bzw. einstündigen Intervallen durchgeführt.

Wie aus Tabelle I zu entnehmen ist, tritt unter dem Einfluß der Überventilation, die im Minimum 12 Liter, im Maximum 43 Liter pro Minute betrug, nicht nur eine sehr starke *Beschleunigung* der *Blutgerinnung* ein, sondern es zeigen sich auch erhebliche Veränderungen der morphotischen Blutelemente nach der quantitativen Seite hin. Die Gerinnungsfähigkeit nimmt in allen Versuchen während der Überventilation erheblich zu, maximal um den 5- bis 6fachen Betrag des Ausgangswertes. Die Zahl der Erythrocyten zeigt während der Versuchsdauer im allgemeinen ein leichtes Ansteigen, dagegen findet sich im leucocytären Blutbild kein einheitliches Verhalten. Was aber besonders auffällt, ist die regelmäßige und sehr starke *Vermehrung der Thrombocyten*, maximal bis auf das 3,5fache vom Wert zu Beginn des Versuchs. Qualitative Änderungen des Blutbildes wesentlicher Art konnten wir nicht beobachten.

Betrachten wir nun noch den Verlauf der *Glykolyse*, so fällt eine sehr *starke Beschleunigung* dieses Prozesses während der Dauer der Überventilation auf. Besonders deutlich zeigt sich dieses Verhalten in den zwei letzten Versuchen der Tabelle I. Während hier zu Beginn der Versuche im gerinnenden Blute nach 5 Minuten die Zuckerabnahmen sich auf $-$ 0,006 bzw. $-$ 0,009% und die Milchsäurezunahmen sich auf + 1 bzw. + 4 mg-% beliefen, so stieg unter dem Einfluß der Überventilation die Glykolyse so an, daß die Zuckerabnahmen $-$ 0,013 bzw. $-$ 0,017% und die Milchsäurezunahmen + 26 bzw. + 12 mg-% betrugen. Dabei muß noch besonders berücksichtigt werden, daß infolge der gleichzeitigen Gerinnungsbeschleunigung die Bestimmung der Glykolyse nicht erst, wie in den Kontrollen, 5 Minuten nach Entnahme des Blutes während der Gerinnung desselben, sondern im Beginn der Gerinnung, im ersten Falle schon nach $2\frac{1}{2}$ Minuten, im zweiten Falle schon nach $2^1/_4$ Minuten vorgenommen werden mußte. Es besteht

[1] Diese Zeitschr. **130**, 463, 1922.
[2] Deutsch. med. Wochenschr. 1926, Nr. 21.
[3] Zeitschr. f. Biol. **77**.

Tabelle

Hypokapnieversuche

	Versuchsdauer in Minuten:	0	30
Hund 1, männlich, 18 kg Gewicht	Gerinnungszeit	9′ 00″	6′ 25″
	Zahl der Thrombocyten	430 000	1 260 000
	„ „ Erythrocyten	7 920 000	7 480 000
	„ „ Leucocyten	13 200	6 5[illegible]
Hund 2, männlich, 16 kg Gewicht	p_H	7,48	7,73
	Gerinnungszeit	7′ 50″	7′ 25″
	Zahl der Thrombocyten	599 000	540 000
	„ „ Erythrocyten	8 360 000	8 080 000
	„ „ Leucocyten	10 000	4 4[illegible]
Hund 3, männlich, 20 kg Gewicht	p_H	7,18	7.35
	Gerinnungszeit	9′ 45″	10′ 50″
	Zahl der Thrombocyten	—	530 000
	„ „ Erythrocyten	5 680 000	4 320 000
	„ „ Leucocyten	6 600	4 8[illegible]
	Zucker direkt nach Entnahme	0,090 %	0,095 %
	Zucker nach 5 Minuten bzw. im Beginn der Gerinnung	0,072 %	0,070 %
	Milchsäure direkt nach Entnahme	12 mg-%	13 mg-%
	Milchsäure nach 5 Minuten bzw. im Beginn der Gerinnung	16 mg-%	16 mg-%
	Glykolyse, Zuckerabnahme	— 0,018 %	— 0,025
	„ Milchsäurezunahme	+ 4 mg-%	+ 3 mg-
Hund 4, männlich, 21 kg Gewicht	p_H	7,32	7.44
	Gerinnungszeit	7′ 30″	2′ 30′
	Zahl der Thrombocyten	400 000	820 000
	„ „ Erythrocyten	4 520 000	5 940 000
	„ „ Leucocyten	9 800	—
	Zucker direkt nach Entnahme	0,096 %	0,097 %
	Zucker nach 5 Minuten bzw. im Beginn der Gerinnung	0,090 %	0,084 %
	Milchsäure direkt nach Entnahme	19 mg-%	7 mg-%
	Milchsäure nach 5 Minuten bzw. im Beginn der Gerinnung	20 mg-%	26 mg-%
	Glykolyse, Zuckerabnahme	— 0,006 %	— 0,013
	„ Milchsäurezunahme	+ 1 mg-%	+ 26 mg-
Hund 5, männlich, 16 kg Gewicht	p_H	7,35	
	Gerinnungszeit	6′ 35″	
	Zahl der Thrombocyten	540 000	
	„ „ Erythrocyten	5 100 000	
	„ „ Leucocyten	6 000	
	Zucker direkt nach Entnahme	0,129 %	
	Zucker nach 5 Minuten bzw. im Beginn der Gerinnung	0,120 %	
	Milchsäure direkt nach Entnahme	12 mg-%	
	Milchsäure nach 5 Minuten bzw. im Beginn der Gerinnung	16 mg-%	
	Glykolyse, Zuckerabnahme	— 0,009 %	
	„ Milchsäurezunahme	+ 4 mg-%	

rch Hyperventilation.

60	90	120	150	180	
					Gr. d. Hyperventilation: 12 Liter pro Minute
7,74 7' 05" 1 580 000 9 260 000 5 000	7,59 7' 45" 954 000 9 620 000 2 600				Größe der Hyperventilation: 36 Liter pro Minute
7,33 4' 40" 550 000 5 680 000 5 600 0,089% 0,068% 13 mg-% 16 mg-% — 0,021% + 3 mg-%					Größe der Hyperventilation: 12 Liter pro Minute
7,56 1' 30' 800 000 6 860 000 — wegen zu plötzlich eintretender Gerinnung waren die Best. unmöglich					Größe der Hyperventilation: 35 Liter pro Minute
7,70 5' 50" 770 000 5 660 000 6 800 0,113% 0,106% 36 mg-% 43 mg-% — 0,007% + 7 mg-%		7,86 6' 05" 480 000 5 260 000 9 000 0,100% 0,082% 46 mg-% 53 mg-% — 0,018% + 7 mg-%		7,89 2' 15" 1 900 000 7 100 000 — 0,085% 0,068% 35 mg-% 47 mg-% — 0,017% + 12 mg-%	Größe der Hyperventilation: 43 Liter pro Minute

Tabelle

Hyperkapnieversuche

	Versuchsdauer in Minuten:	0
Hund 6, männlich, 18 kg Gewicht	p_H	7,30
	Gerinnungszeit	6′ 15″
	Zahl der Thrombocyten	740 000
	„ „ Erythrocyten	5 480 000
	„ „ Leucocyten	6 400
	Zucker direkt nach Entnahme	0,116 %
	Zucker nach 5 Minuten bzw. im Beginn der Gerinnung	0,112 %
	Zuckerabnahme	— 0,004 %
Hund 7, männlich, 18 kg Gewicht	p_H	7,32
	Gerinnungszeit	7′ 05″
	Zahl der Thrombocyten	880 000
	„ „ Erythrocyten	7 220 000
	„ „ Leucocyten	7 000
	Zucker direkt nach Entnahme	0,095 %
	Zucker nach 5 Minuten bzw. im Beginn der Gerinnung	0,091 %
	Zuckerabnahme	— 0,004 %
Hund 8, männlich, 10 kg Gewicht	p_H	7,25
	Gerinnungszeit	8′ 10″
	Zahl der Thrombocyten	760 000
	„ „ Erythrocyten	5 780 000
	„ „ Leucocyten	6 600
	Zucker direkt nach Entnahme	0,136 %
	Zucker nach 5 Minuten bzw. im Beginn der Gerinnung	0,130 %
	Milchsäure direkt nach Entnahme	12 mg-%
	„ nach 5 Minuten bzw. im Beginn der Gerinnung	15 mg-%
	Glykolyse, Zuckerabnahme	— 0,006 %
	„ Milchsäurezunahme	+ 3 mg-%
Hund 9, männlich, 12 kg Gewicht	p_H	7,35
	Gerinnungszeit	4′ 15″
	Zahl der Thrombocyten	554 000
	„ „ Erythrocyten	5 540 000
	„ „ Leucocyten	8 400
	Zucker direkt nach Entnahme	0,107 %
	„ im Beginn der Gerinnung	0,103 %
	Milchsäure direkt nach Entnahme	13 mg-%
	„ im Beginn der Gerinnung	15 mg-%
	Glykolyse, Zuckerabnahme	— 0,004 %
	„ Milchsäurezunahme	+ 2 mg-%

rch CO_2-Atmung.

30	60	120	
7,21	7,16	7,14	
5′ 15″	2′ 25″	3′ 00	
770 000	1 430 000	Wegen Zerfalls nicht zählbar	
5 720 000	6 780 000	5 720 000	7 Liter pro Minute
9 000	—	8 800	10 % CO_2
0,080 %	0,064 %	0,064 %	
0,075 %	0,056 %	0,054 %	
— 0,005 %	— 0,008 %	— 0,010 %	
7,12	7,08	7,08	
6′ 45″	2′ 50″	2′ 00″	
940 000	1 700 000	Wegen Zerfalls nicht zählbar	
6 100 000	7 180 000	7 140 000	7 Liter pro Minute
6 200	—	—	10 % CO_2
0,100 %	0,098 %	Bestimmung ging verloren wegen zu plötzlich eintretender Gerinnung	
0,095 %	0,089 %		
— 0,005 %	— 0,009 %		
	7,14	7,06	
	2′ 30″	1′ 30″	
	2 000 000	Wegen Zerfalls nicht zählbar	
	6 540 000	4 580 000	
	—	—	
	0,120 %	0,107 %	6,5 Liter pro Minute
	0,114 %	0,089 %	10 % CO_2
	7 mg-%	9 mg-%	
	11 mg-%	12 mg-%	
	— 0,006 %	— 0,018 %	
	+ 4 mg-%	+ 3 mg-%	
—		7,06	
1′ 00″		0′ 50″	
egen Zerfalls nicht zählbar		Wegen Zerfalls nicht zählbar	
5 000 000		5 480 000	
—		—	
0,093 %		0,078 %	7 Liter pro Minute
0,080 %		0,071 %	10 % CO_2
11 mg-%		9 mg-%	
13 mg-%		12 mg-%	
— 0,013 %		— 0,007 %	
+ 2 mg-%		+ 3 mg-%	

also auch hier, wie in unseren früheren Versuchen, eine *vollkommene Proportionalität* zwischen *Beschleunigung* der *Blutgerinnung* einerseits und *Geschwindigkeit der Blutglykolyse* andererseits. Diese starke Beschleunigung des Blutzuckerabbaues dürfte nicht allein mit der durch die Überventilation bedingten Alkalosis, die maximal bis zu einem $p_H = 7{,}89$ anstieg, ursächlich verknüpft sein, vielmehr glauben wir als wesentliches ätiologisches Moment dafür, genau wie für die Gerinnungszunahme, die *starke Thrombocytenvermehrung* verantwortlich machen zu müssen.

Gehen wir nun zur Besprechung der in Tabelle II wiedergegebenen Versuche mit künstlicher CO_2-Atmung über, so zeigen sich hier ganz analoge Ergebnisse. Die *Gerinnungsbeschleunigung* tritt hier noch deutlicher zutage als bei den Überventilationsversuchen. Maximal geht die Gerinnungszeit bis auf ein Achtel des ursprünglichen Zeitwertes zurück. Auch hier stoßen wir wieder auf eine besonders starke *Vermehrung der Thrombocyten* durch die CO_2-Atmung, maximal bis auf nahezu den 3fachen Betrag des Ausgangswertes. Schon bei den Überventilationsversuchen fiel uns auf, daß mit der Zunahme der Thrombocyten auch ihre *Neigung zum Zerfall* wuchs. Das zeigte sich in den Versuchen mit CO_2-Atmung in noch weit ausgesprochener Weise. Obwohl die *Hofmann-Flössner*sche Methode der Thrombocytenzählung zweifelsohne das schonendste Verfahren darstellt, das wir zurzeit besitzen, und wir so rasch wie möglich arbeiteten, gelang es uns in den Versuchen der Tabelle II vielfach nicht, eine Zählung der Thrombocyten durchzuführen, weil dieselben trotz aller Kautelen *sofort zerfielen*. Und zwar war es meist dann der Fall, wenn auf Grund der CO_2-Atmung die Gerinnungsbeschleunigung am stärksten war. Das Blutbild war dann infolge des massenhaften Unterganges der Thrombocyten wie mit kleinen Körnchen übersät. Aus diesem Grunde dürften die oben angebenen Maximalwerte der Thrombocytenvermehrung unter CO_2-Einfluß sicher noch zu niedrig sein. Die übrigen Veränderungen des Blutbildes, sowohl in quantitativer als auch in qualitativer Hinsicht, sind auch hier nicht wesentlich von Bedeutung.

Aber auch in diesen Versuchen stoßen wir wieder auf eine ganz ausgesprochene *Beschleunigung der Zuckerzerstörung, parallel der Zunahme der Gerinnungsfähigkeit.* Besonders deutlich zeigt sich dieses Verhalten in den beiden letzten Versuchen der Tabelle II, in denen auch die Veränderungen der Milchsäurewerte unter dem Einfluß der CO_2-Atmung berücksichtigt wurden. So beträgt im vorletzten Versuch die Zuckerabnahme bzw. Milchsäurezunahme im gerinnenden Blut, 5 Minuten nach Entnahme aus dem Gefäß, — 0,006% bzw. + 3 mg-%. nach 2stündiger CO_2-Atmung im Beginn der Gerinnung, trotz Herabgehens der Gerinnungszeit auf 1 Minute 30 Sekunden, aber — 0,018%

bzw. + 3 mg-%. Im letzten Versuche ergab sich bei einer Gerinnungszeit von 4 Minuten 15 Sekunden zu Beginn des Versuchs eine Zuckerabnahme von — 0,004 % und eine Milchsäurezunahme von + 2 mg-%, nach 2stündiger CO_2-Atmung waren aber trotz starker Verminderung der Gerinnungszeit auf nur *50 Sekunden* die entsprechenden Werte — 0,007 % bzw. + 3 mg-%.

Vergegenwärtigt man sich die großen *zeitlichen* Differenzen infolge der Gerinnungssteigerung, so ist die *Beschleunigung der Zuckerzerstörung* besonders in die Augen springend. Und auch hier ergibt sich wieder die *Parallelität* zwischen Beschleunigung der Glykose und der Blutgerinnung besonders deutlich. Die von uns nachgewiesene starke Zunahme der Gerinnungsfähigkeit des Blutes unter der Einwirkung der CO_2-Atmung dürfte durch mehrere Faktoren bedingt sein. Zunächst wird die Verschiebung der Blutreaktion nach der *sauren Seite*, in unseren Versuchen maximal bis zu einem $p_H = 7{,}06$, die Entladung und damit die Flockung der Plasmaeiweißkörper begünstigen. Außerdem spielen aber auch hier die *Thrombocytensteigerung* und die vermehrte Neigung der Thrombocyten zum Zerfall, ferner die starke *Zunahme der Blutglykolyse* die Hauptrolle. Die Steigerung der $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration dürfte in unseren Versuchen zu klein sein, um die Glykolyse in negativem Sinne zu beeinflussen. Wohl aber könnte außer durch die Thrombocytenvermehrung auch durch die bei längerer CO_2-Atmung eintretende geringere Bindungsfähigkeit des Oxyhämoglobins für Sauerstoff die Glykolyse begünstigt werden.

Durch die bekannten Untersuchungen von *Michaelis* und von *Rona* wissen wir, daß die Blutglykolyse an die morphotischen Blutelemente, und zwar an Erythrocyten und an Leucocyten, geknüpft ist. Es erscheint uns aber auf Grund dieser Untersuchung sehr wahrscheinlich, daß auch die *Thrombocyten* an diesem Prozesse wesentlich beteiligt sind. Jedenfalls spricht die in unseren Versuchen zutage tretende *Übereinstimmung* zwischen Beschleunigung der Blutgerinnung und Blutglykolyse einerseits und Thrombocytenvermehrung andererseits, bei sonst unwesentlichen Veränderungen der übrigen korpuskulären Blutelemente, in diesem Sinne. Man wird sich in dieser Hinsicht mit relativen Schlüssen zurzeit begnügen müssen, da eine *quantitative* Erfassung der Thrombocyten, abgetrennt von den übrigen Blutelementen, uns nicht möglich erscheint. Wir können in dieser Hinsicht die Angaben von *Hofmann* und seinen Schülern über die ungemein leichte Vulnerabilität der Thrombocyten, vor allem der kleinen Formen, bestätigen. Wenn man noch so vorsichtig vorgeht, so treten schon nach wenigen Minuten Zerfallserscheinungen auf. Von einem Abzentrifugieren der Plättchen, um sie getrennt auf ihr glykolytisches Vermögen zu prüfen, haben wir deshalb Abstand genommen, da man unter diesen Umständen

kaum die Hälfte der Thrombocyten, und zwar günstigstenfalls nur die *großen, resistenteren* Formen zu fassen bekommt, und gerade sie dürften im Gegensatz zu den leicht zerfallenden *kleinen Thrombocyten* für die in Frage stehenden biologischen Prozesse von weit untergeordneterer Bedeutung sein. Auch diese Untersuchungen haben uns erneut eine Bestätigung von den *ursächlichen* Beziehungen der *Blutglykolyse* zum *Gerinnungsablauf* gebracht. Sie zeigen, wie unter den experimentellen Bedingungen der *Hypo- und Hyperkapnie, Gerinnungszeit und Verlauf der Blutglykolyse sich gleichsinnig ändern.* Dabei sehen wir in der Änderung des biologischen Prozesses der *Blutzuckerzerstörung* das *primäre* Moment, das den *Gerinnungsverlauf* in seinem *zeitlichen* Ausmaß *absulot beherrscht*, wobei wir auch die nachgewiesene *Thrombocytenvermehrung* in *direkten* Zusammenhang mit der Beschleunigung der Blutglykolyse setzen, und dementsprechend die Zunahme der Gerinnungsfähigkeit nur als *indirekte* Folge der Thrombocytenzunahme betrachten möchten. Daß gerade die auch klinisch realisierbaren Bedingungen der Hypo- und Hyperkapnie derartig ausgesprochene Veränderungen des Gerinnungssystems hervorrufen können, scheint uns im Hinblick auf *pathologische* Zustände ätiologisch nicht unwichtig zu sein. Wir werden darüber demnächst berichten.

Zusammenfassung.

Es konnte experimentell nachgewiesen werden, daß unter dem Einfluß von *Hypo- und Hyperkapnie* die *Gerinnungsfähigkeit* des Blutes *stark erhöht* und die *Blutglykolyse erheblich beschleunigt wird.* In beiden Fällen zeigt sich eine sehr ausgesprochene *Vermehrung* der *Thrombocyten.* Auf die *Parallelität* zwischen Beschleunigung von Blutgerinnung einerseits und Blutglykolyse andererseits wird erneut hingewiesen. Beziehungen zwischen *gesteigerter Blutglykolyse und Thrombocytenvermehrung* werden wahrscheinlich gemacht. In diesem Sinne ist letztere nur *indirekt* für die Gerinnungsbeschleunigung verantwortlich. Als *primäres* Moment für die *Gerinnungszunahme* wird die gleichsinnige Änderung der *Blutglykolyse* betrachtet.

Stoffwechsel der Blutplättchen.

Von

G. Endres und **F. Kubowitz.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 28. Oktober 1927.)

Warburg und *Onaka*[1] sowie bald darauf *Morawitz* und *Loeber*[2] haben die Atmung der Blutplättchen gemessen, indem sie die Sauerstoffzehrung von Hirudinblut und defibriniertem Blut verglichen. Gibt dieses Verfahren auch ungefähr richtige Resultate, so werden die Versuche doch durch die Anwesenheit der roten Blutzellen, deren Stoffwechsel nicht immer zu vernachlässigen ist, kompliziert. Wir haben diese Komplikation vermieden, indem wir die Atmung der Blutplättchen nach Entfernung der roten Blutzellen untersuchten. Neben der Atmung haben wir auch die anaerobe Glykolyse gemessen.

Versuchsanordnung.

3 Volumina Blut wurden mit 1 Volumen Citrat (1,1 % Na_3-Citrat, 0,7 % NaCl) vermischt. Nach einer Vorschrift von *Morawitz*[3] wurde zentrifugiert, bis sich die roten und die Hauptmenge der weißen Blutzellen abgesetzt hatten. Dann wurde das Plasma, das die Plättchen enthielt, abgehoben und der Stoffwechsel nach Zusatz von Bicarbonat und Glucose manometrisch gemessen[4]. Die Bicarbonatkonzentration war $2{,}5 \cdot 10^{-2}$ n, die Glucosekonzentration etwa $1 \cdot 10^{-2}$ n.

---

[1] Zeitschr. f. physiol. Chem. **71**, 193, 1911 (3. April).
[2] Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **140**, 281, 1911 (24. Mai).
[3] Deutsch. Arch. f. klin. Med. **79**, 215, 1904.
[4] *O. Warburg*, Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin, Springer, 1926.

In den ersten Versuchen (1 bis 3 der Tabelle) wurden die Blutplättchen durch weiteres Zentrifugieren in besonders geformten Hämatokriten[1] [2] konzentriert. Später zeigte sich, daß dies überflüssig ist, da auch ohne Konzentrierung der Plättchen die manometrischen Ausschläge hinreichend groß waren.

Das menschliche Blut wurde aus der Armvene gewonnen, das Hundeblut aus der Arterie femoralis (Morphiumnarkose).

Zellvolumen und Zellgewicht wurden, wie in der Arbeit über den Stoffwechsel der weißen Blutzellen beschrieben ist, bestimmt[3] [4].

Ergebnisse.

Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengestellt. In Protokoll I ist ein Versuchsbeispiel mit allen experimentellen Einzelheiten wiedergegeben. Die anaerobe Glykolyse der Blutplättchen ist beträchtlich und wird durch die Atmung im wesentlichen zum Verschwinden gebracht. Auffällig ist dabei, daß eine Atmung von rund 5 zur Beseitigung einer Glykolyse von 17 bis 22 genügt.

Tabelle I.

Versuchstemperatur 37,7°. Citratplasma. Aerob: 5% CO_2 in Luft. Anaerob: 5% CO_2 in Stickstoff.

Nr.	Blutplättchen von	Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$	$Q_M^{N_2}$
1	Mensch	— 8,4	+ 5,3	+ 21
2	Hund	— 5,4	0	+ 22
3	Hund	— 4,9	0	+ 18
4	Hund	— 4,9	+ 1	+ 18
5	Hund	— 5,2	0	+ 18
6	Hund	— 5,2	+ 1	+ 17

[1] *G. Endres*, Zeitschr. f. Biol. **86**, 260, 1927.

[2] Herr Prof. *M. von Frey*-Würzburg stellte sie uns in freundlicher Weise zu unseren Versuchen zur Verfügung, wofür wir ihm auch an dieser Stelle unseren Dank aussprechen.

[3] *Fleischmann* und *Kubowitz*, diese Zeitschr. **181**, 395, 1927.

[4] Mein Einwand (*G. Endres*, Zeitschr. f. Biol. **86**, 260, 1927), der von *Fleischmann* und *Kubowitz* gemessene Leucocytenstoffwechsel sei zum Teil Stoffwechsel der Blutplättchen gewesen, ist nicht stichhaltig, weil im Blute der von *Fleischmann* und *Kubowitz* benutzten Versuchstiere (Gänse) keine Blutplättchen vorkommen. *Endres.*

Protokoll I (Versuch 5 der Tabelle I).

Blutplättchen aus Hundeblut; gemessen in Citratplasma, 37,7° C. Bicarbonat: 2,5 . 10^{-2} Mole/Liter. Zugesetzte Glucose: 1,5 g/Liter. 3 ccm Suspension enthielten 1,26 mg Blutplättchentrockensubstanz.

v_F = Volumen der Suspension.

	Gefäß A	Gefäß B	Gefäß C
Gasraum	5 % CO_2 in Luft	5 % CO_2 in Luft	5 % CO_2 in N_2*
Volumina in ccm	$v_F = 7$ $v_G = 6{,}33$	$v_F = 3$ $v_G = 10{,}20$	$v_F = 3$ $v_G = 10{,}03$
Gefäßkonstanten in qmm	$K_{O_2} = 0{,}574$ $K_{CO_2}^{Ringer} = 0{,}935$ $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_C = 0{,}048$ $K_{CO_2}^S = 1{,}271$	$k_{O_2} = 0{,}905$ $k_{CO_2}^{Ringer} = 1{,}06$ $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_C = 0{,}048$ $k_{CO_2}^S = 1{,}204$	$k_{CO_2}^{Ringer} = 1{,}045$ $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M = 0{,}066$ $k_M = 1{,}243$
Druckänderung in 20′	$H = -4{,}5$ mm $H = -4{,}5$ mm $H = -5$ mm	$h = -0{,}5$ mm $h = -0$ mm $h = -1$ mm	$h = +6{,}5$ mm $h = +6{,}5$ mm $h = +6$ mm
	$Q_{O_2} = -5{,}25$ $Q_M^{O_2} = +0{,}5$	—	$Q_M^{N_2} = +18{,}25$

* In den anaeroben Versuchen wurden die Gasmischungen über glühendem Kupfer vom Sauerstoff befreit.

Herrn *O. Warburg* sprechen wir für die Hilfe bei dieser Arbeit unseren Dank aus.

Intermediärer Kohlehydratstoffwechsel.

V. Mitteilung:

Einfluß der Amytal-Narkose auf die verschiedenen Reaktionsformen des Hundes bei intravenöser Dauerinjektion des Traubenzuckers.

Von

M. Wierzuchowski und **H. Gadomska.**

(Aus der Stoffwechselabteilung und dem Institut für physiologische Chemie der Universität Warschau.)

(Eingegangen am 1. November 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

In der Absicht, die von uns bei der intravenösen Glykosedauerinfusion isolierten Reaktionsformen des Hundes (1) unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen, haben wir zuerst die Narkose angewandt. Als Narkoticum haben wir ausschließlich das „Amytal“ (Iso-amyläthylbarbitursäure) benutzt, da *Deuel*, *Chambers* und *Milhorat* (2) (in Professor *G. Lusks* Laboratorium) unwiderlegbar nachgewiesen haben, daß man während der Amytal-Narkose beim Hunde im Blutzuckerspiegel keine erheblichen Abweichungen von der Norm findet, und daß, falls kein Schüttelfrost eintritt, in der Wärmeproduktion keine irgendwie bedeutende Veränderung entsteht. Da sich auch gezeigt hat, daß während der Amytal-Narkose eingespritztes Insulin die gewöhnliche hypoglykämische Wirkung, aber ohne Krämpfe, hervorruft, so war es klar, daß Amytal den Kohlehydratstoffwechsel in hohem Grade unbeeinflußt läßt. Wir wandten eine bis zu 20 Stunden dauernde gleichmäßige, tiefe Narkose an, die wir auf folgende Weise erreichten. Als erste Dosis wurden immer 65 mg Natriumsalz des Amytals pro Kilogramm Körpergewicht intraperitoneal eingespritzt. Tiefe Narkose (unten charakterisiert) entweder ohne oder mit einem sehr geringen Exzitationsstadium erfolgte innerhalb etwa 10 Minuten und dauerte einige Stunden. In dem Maße, als die fortwährende Kontrolle der Reflexe ein Nachlassen der Tiefe der Narkose anzeigte, wurde von Zeit zu Zeit je 10 mg Amytal pro Kilogramm intraperitoneal nachgespritzt, so daß zusammen während

eines Versuchs etwa 0,1 g pro Kilogramm oder mehr injiziert wurde. Das Verhalten der Reflexe des Tieres galt als Maß für die Stärke der Narkose. Der Narkoseversuch wurde nur in dem Falle angefangen und fortgeführt, wenn das Tier vollständige Analgesie für einen tiefen Einstich mit der Nadel, keinen Extensorenreflex bei taktiler Reizung der Haut am Bauche, keinen Schluckreflex bei einige Male wiederholtem Einführen eines Wattebausches in die Rachenhöhle bis zum Ösophagus aufwies, dagegen aber Schüttelfrost (in unseren Versuchen selten abwesend) und der Cornealreflex vorhanden waren. *Cheyne-Stokes*sches Atmen und *totale* Abwesenheit des Cornealreflexes waren Vorzeichen eines tödlichen Ausganges der Narkose, mit Ausnahme der Hündin Nr. 12, bei welcher selbst der Schluckreflex wiederkehrte, während der Cornealreflex noch immer fehlte. Ein Absinken der Körpertemperatur, das zuweilen 3° betrug, zusammen mit Schüttelfrost, zeigte sich in den meisten Fällen [mit einer Ausnahme, wo der Schüttelfrost während der ganzen Versuchsdauer vorhanden war und die Körpertemperatur (im Rektum gemessen) konstant 39° betrug]. Der Schüttelfrost soll hier ein regulativer Vorgang sein, der zur Erhöhung der sinkenden Körperwärme bestimmt ist, wobei sich die Wärmeproduktion verdoppelt [*Deuel*, *Chambers* und *Milhorat* (2)]. Die Amytal-Lösung wurde alle 2 Wochen frisch bereitet. *Edwards* und *Page* (3) haben gezeigt, daß Amytal in Dosen von 50 bis 60 mg pro Kilogramm ohne Einfluß auf das Zirkulationssystem ist. Unsere Tiere haben diese Narkose zuweilen einige Male ohne sichtbaren Einfluß auf ihre Gesundheit durchgemacht. Wir haben eine Kontraindikation gefunden. Die graviden Tiere, die dem Wurfe nahe waren, bedurften einer viel stärkeren, manchmal fast verdoppelten Amytal-Gabe. Das Tier überlebte niemals eine solche Dosis. Die sonstige Technik war dieselbe, wie sie in der ersten Mitteilung beschrieben wurde.

Resultate.

Der Versuch in Tabelle I bestätigt die Angaben anderer Forscher, daß tiefe Amytal-Narkose keinen besonderen Einfluß (die geringfügige Blutzuckersenkung, die in diesem Versuch erscheint, kann auch beim hungernden Tiere ohne Narkose sich bemerkbar machen) auf den Blutzuckerspiegel ausübt, obwohl die Körperwärme stark gesunken und wieder gestiegen ist und im Zusammenhang damit das Tier erheblichen Schüttelfrost hatte. Auch die Milchsäure im Blute unterliegt dabei keinen bedeutenden Veränderungen. Dagegen hat Insulin während dieser Narkose (Tabelle I) eine gewöhnliche Hypoglykämie mit typischer Erhöhung der Blutmilchsäurewerte hervorgerufen, wobei keine motorischen und respiratorischen Störungen, die

Tabelle I.

Hündin Nr. 11, Versuch 1 ohne Insulin, Versuch 2 mit Insulin. Körpergewicht 19,2 kg. Amytal-Narkose *ohne* Glykoseinfusion.

	Versuch 1. 30. April 1927				Versuch 2. 6 Mai 1927			
	Blut		Rektaltemperatur	Bemerkungen	Blut		Rektaltemperatur	Bemerkungen
	Zucker mg-%	Milchsäure mg-%	°C		Zucker mg-%	Milchsäure mg-%	°C	
Nüchtern vor der Narkose	85	16,5	38,7	Normal	84	14,5		Normal
0,00	Tiefe Narkose				Tiefe Narkose + 100 Insulin-E.			
1h in 15' .	88	17,0					37,9	Atem ruhig, nicht beschleunigt
1h			37,2		72	27,2		
1h „ 49' .	86	16,3						
2	82	14,0	36,5	Schüttelfrost	35	22,1	37,0	Kein Schüttelfrost und kein Cornealreflex bis zum Ende des Versuchs
4	80	16,1	35,7	„	33	21,2	36,0	
6	81	14,5	36,7		30	15,9	35,7	
8	82	16,5	37,9	Kein Schüttelfrost	27	13,0	35,2	
10	73	20,9	37,9		37	14,8	35,4	
12					30	16,5		

für die Insulinreaktion im wachen Zustande charakteristisch sind, hervortraten und nur das Verschwinden des Cornealreflexes und das Nichtauftreten des Schüttelfrostes bei der gleichen Amytal-Gabe wie im Kontrollversuch, die sich an die Narkose anschließende hypoglykämische Reaktion verraten. In der sechsten Versuchsstunde hat der Milchsäurespiegel den Anfangswert erreicht, auf solche Weise eine Kurve beschreibend, die z. B. von *Kuhn* und *Baur* (4) beim normalen Tiere ohne Narkose (Ziege) beobachtet worden ist. Angesichts dieser befriedigenden Ergebnisse haben wir die Versuche mit intravenöser kontinuierlicher Traubenzuckerinjektion (2 g Glykose pro Kilogramm Körpergewicht pro Stunde) angestellt, wobei wir eine spezielle Aufmerksamkeit auf

1. die durchschnittliche assimilative Geschwindigkeit für Glykose,
2. die Form der Harn- und Blutzuckerkurven, und
3. die Blutmilchsäurekurve

während mehrere Stunden dauernder Versuche lenkten. Die Narkoseversuche wurden zwecks Vergleichs an denselben Tieren ausgeführt, bei denen die charakteristischen Reaktionen in der vorhergehenden Arbeit (IV. Mitteilung) gefunden worden waren.

A. Die assimilative Reaktion von abfallender Form bei Hündin Nr. 12 (vgl. IV. Mitteilung, Tabelle IV) findet ihr Korrelat während der

Narkose in der Abb. 1. Die Reaktion ist dreiphasig: die erste Phase zeigt während der ersten 3 Stunden die höchste Glykosurie (durchschnittlich 0,276 g/kg und Stunde), die zweite — die niedrigste während

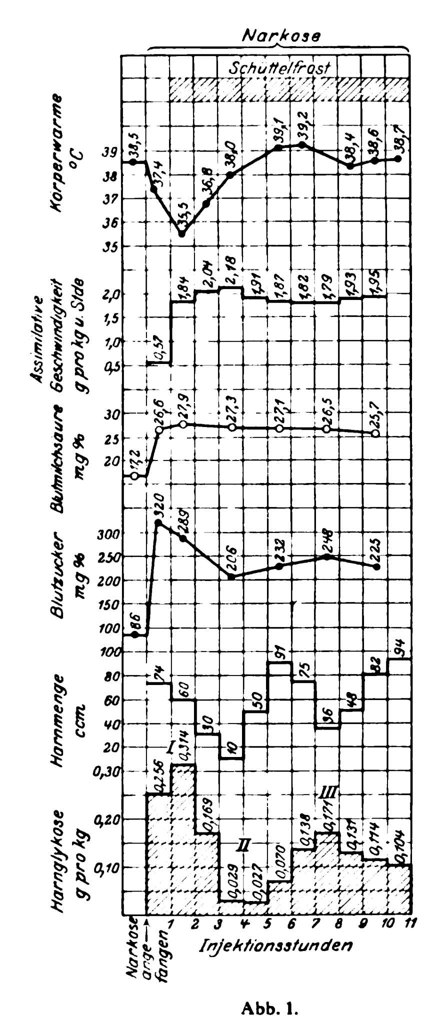


Abb. 1.
Hündin 12, Versuch 3. Körpergewicht 15,0 kg. Seit 40 Tagen im Laboratorium.
Narkose beim Tiere mit assimilativer zweiphasiger Reaktion.

der vierten bis fünften Stunde (0,028 g/kg und Stunde), die dritte — einen Anstieg mit darauf folgendem Absinken der Glykosurie (0,121 g/kg und Stunde). Alle drei Phasen spiegeln die Blutzuckerkurve wieder. Im allgemeinen ist es ein etwas verunstaltetes Bild des Versuchs ohne Narkose.

Hündin Nr. 10 (normale Reaktion assimilativ platt, IV. Mitteilung, Tabelle VI) zeigt während der Narkose (Tabelle II) eine zweiphasige Form der Zuckerkurven. Die erste Periode dauert bis zur fünften Stunde (durchschnittliche Glykosurie 0,236 g), die zweite von der sechsten bis elften Stunde (Glykosurie 0,102 g/kg und Stunde). Da der Blutzucker einen entsprechenden gewaltigen Sturz aufweist und sich ganz parallel zur Harnzuckerkurve verhält, so kann man sagen, daß diese Hündin während der Narkose eine im wachen Zustande latente, anfängliche assimilative Schwäche zeigt.

Tabelle II.

Hündin Nr. 10, Versuch 3, Körpergewicht 10,6 kg. Seit 42 Tagen im Laboratorium. Einfluß der Narkose auf die assimilative platte Reaktion.

	Harn			Blut		Assimilative Geschwindigkeit pro kg und Std.	Periode	Rektaltemperatur	Bemerkungen
	Menge	Glykose gefunden	Glykose pro kg	Zucker	Milchsäure				
	ccm	g	g	mg-%	mg-%	g		°C	
27. IV. 1927 Nüchtern vor der Narkose		0		79	23,1			38,2	
				Tiefe Narkose					
1. Injektionsstunde	33	2,53	0,239	340	31,1	0,46	I	37,6	
2. „	44	3,55	0,335	277	35,3	1,98		36,4	Schüttelfrost
3. „	27	2,42	0,228			1,86			„
4. „	26	2,18	0,206	243	31,0	1,88		35,9	„
5. „	24	1,82	0,172			1,96		36,4	„
Durchschnitt:			0,236						
6. Injektionsstunde	28	0,91	0,086	189	30,8	2,05	II		„
7. „	83	0,70	0,066			1,88			„
8. „	54	1,03	0,097	211	33,5	1,85		37,5	„
9. „	60	1,37	0,129			1,88			„
10. „	80	1,18	0,111	207	34,2	1,90			„
11. „	125	1,27	0,120					38,6	„
Durchschnitt:			0,102						

B. Die subassimilative Reaktion von ansteigendem Typus (vgl. IV. Mitteilung, Tabellen VII bis IX, Abb. 2) verändert ihre Form während der Narkose gar nicht, wie man aus Tabelle III schließen kann, die Glykosurie vermehrt sich ständig von Anfang an bis zu Ende des Versuchs und erreicht in den letzten Stunden den Wert von 32 % der gleichzeitig injizierten Menge. Auch während der Narkose ist Insulin, das

Tabelle III.

Hündin Nr. 3, Versuch 2. Körpergewicht 13,5 kg. Seit 35 Tagen im Laboratorium. Narkoseeinfluß auf die subassimilative ansteigende Reaktion.

	Harn			Zucker im Blute	Assimilative Geschwindigkeit pro kg und Std.
	Menge	Glykose			
		gefunden	pro kg		
	ccm	g	g	mg-%	g
9. II. 1927 Nüchtern vor der Narkose		0		80	
		Tiefe Narkose			
1. Injektionsstunde	58	4,98	0,369		
2. „	58	4,98	0,369		
3. „	61	4,08	0,302		
4. „	61	4,08	0,302	287	
5. „	95	4,74	0,351	314	1,51
6. „	95	4,74	0,351	287	1,78
7. „	89	4,50	0,333	323	1,49
8. „	89	4,50	0,333		1,72
9. „	74	5,22	0,387	301	1,67
10. „	74	5,22	0,387		1,50
11. „	93	6,38	0,473	346	1,41
12. „	93	6,38	0,473		1,63
13. „	101	8,64	0,640	307	1,46
14. „	101	8,64	0,640		1,36

während der Glykoseinfusion diesem Tiere einverleibt worden ist, ohne Einfluß auf den Verlauf der Zuckerkurven, was ohne Zweifel aus Abb. 2 hervorgeht. In der Tabelle III hat die Narkose die Harnzuckerausscheidung während der ersten 8 Stunden um 0,128 g/kg pro Stunde und in Abb. 2 um 0,126 g vermehrt im Verhältnis zu den entsprechenden normalen Versuchen (vgl. IV. Mitteilung, Tabellen VII und IX), also um einen ungefähr identischen Wert. Der Zuwachs der Glykosurie war in diesem Falle auf verschiedenen assimilativen Höhen derselbe (die Glykosurie im normalen Versuch ohne Narkose betrug im ersten Falle 12 % und im zweiten 17 % der injizierten Menge). Das Verhältnis war additiv. In Abb. 2 ist an den langsam ansteigenden Zuckerkurven während der vier ersten Versuchsstunden eine plötzliche Steigerung bemerkbar; die Reaktion wurde auf diese Weise zweiphasig. Das ist nichts Neues, es bedeutet nur eine Vergrößerung des in den Versuchen an dieser Hündin oft getroffenen anfänglichen kurzdauernden Ansteigens der Blutzucker- und zuweilen auch der Harnzuckerkurve (vgl. IV. Mitteilung, Tabelle IX, Abb. 2).

Die flache subassimilative Reaktionsform der Hündin Nr. 5 (vgl. IV. Mitteilung, Tabelle X) wird während der Narkose ziemlich

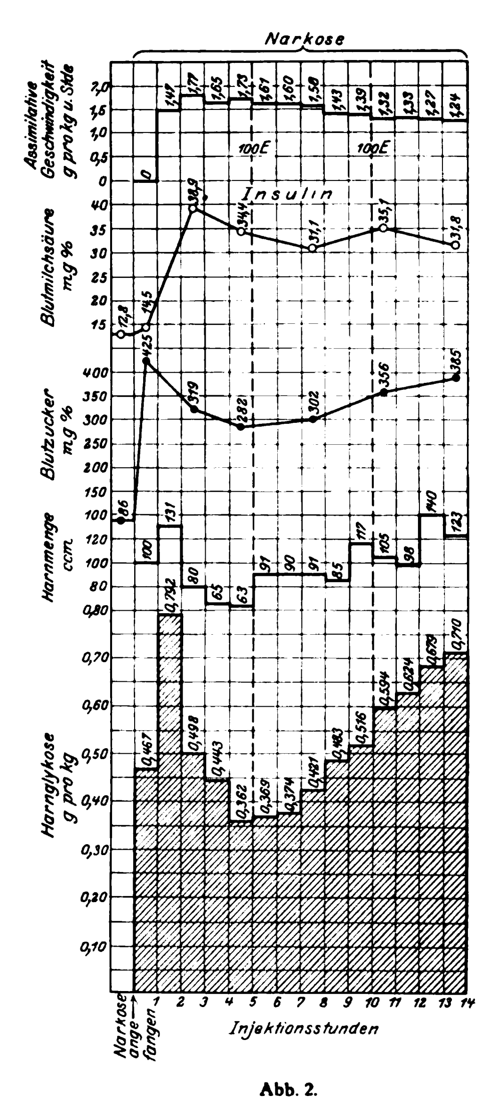


Abb. 2.

Hündin 3, Versuch 6. Körpergewicht 12,7 kg. Seit 75 Tagen im Laboratorium. Insulin während der Narkose beim subassimilativen ansteigenden Reaktionstypus.

weitgehend verkrümmt (Tabelle IV), die Zuckerkurven sind nicht mehr flach, sondern zeigen eine starke Erhöhung in der Mitte des Versuchs und fallen gegen Anfang und Ende.

Tabelle IV.

Hündin Nr. 5, Versuch 2. Körpergewicht 11,7 kg. Seit 49 Tagen im Laboratorium. Narkose beim Tiere mit assimilativer platter Reaktion.

	Harn			Blut		Assimilative Geschwindigkeit pro kg u. Std.
	Menge	Glykose		Zucker	Milchsäure	
		gefunden	pro kg			
	ccm	g	g	mg-%	mg-%	g
17. II. 1927 Nüchtern v. d. Narkose		0		82	18,4	
	Tiefe Narkose					
1. Injektionsstunde . .	32	3,33	0,285			
2. „ . .	32	3,33	0,285	362	37,8	
3. „ . .	64	6,03	0,515			1,28
4. „ . .	64	6,03	0,515	443	44,2	1,28
5. „ . .	54	5,35	0,457			1,74
6. „ . .	54	5,35	0,457	366	49,1	1,74
7. „ . .	40	4,12	0,352			1,68
8. „ . .	40	4,12	0,352	355	39,3	1,68

Tabelle V.

Hündin Nr. 9, Versuch 5. Körpergewicht 17,4 kg. Seit 56 Tagen im Laboratorium. Narkose beim Tiere mit subassimilativer zweiphasiger Reaktion.

	Harn			Blut		Assimilative Geschwindigkeit pro kg u. Std.	Rektaltemperatur	Bemerkungen
	Menge	Glykose		Zucker	Milchsäure			
		gefunden	pro kg					
	ccm	g	g	mg-%	mg-%	g	°C	
19. V. 1927 Nüchtern v. d. Narkose		0		79	16,9		38,8	
	Tiefe Narkose							
1. Injektionsstunde *	91	5,59	0,321	354	27,8	0,30	35,6	Schüttelfrost
2. „	90	9,62	0,553	349	—	1,63	35,6	„
3. „	86	6,73	0,387			1,76	35,9	„
4. „	115	6,24	0,359	289	—	1,79	37,2	„
5. „	190	8,28	0,476			1,50		„
6. „	195	7,55	0,434	297	35,3	1,55	37,0	„
7. „	157	7,52	0,432			1,63	37,4	„
8. „	105	6,31	0,363	274	32,7	1,70		„
9. „	86	7,24	0,416			1,48		„
10. „	106	9,45	0,543	315	31,0	1,35	37,3	Kein Schüttelfrost
11. „	104	9,15	0,526			1,43		
12. „	115	9,95	0,572	332	36,4	1,39	36,3	

* Glykoseinfusion begann eine Stunde nach dem Eintreten der tiefen Narkose.

Wie sich die subassimilative zweiphasige Reaktion bei der Narkose verhält, ist in Tabelle V dargestellt. Auch hier kann man in der Blut-

zuckerkurve zwei Perioden unterscheiden: die erste, kurze, 2 Stunden dauernd, mit hohem Blutzuckergehalt, und die zweite mit niedrigem und langsam steigend. Die Harnzuckerkurve verläuft dagegen wellenförmig. In der Tabelle VI, in der der Insulineinfluß auf diese Reaktion

Tabelle VI.

Hündin Nr. 9, Versuch 6. Körpergewicht 16,8 kg. 63 Tage im Laboratorium. Insulin während der Narkose beim subassimilativen zweiphasigen Typus.

	Harn			Blut		Assimilative Geschwindigkeit pro kg u. Std.	Periode	Rektaltemperatur	Bemerkungen
	Menge	Glykose gefunden	Glykose pro kg	Zucker	Milchsäure				
	ccm	g	g	mg-%	mg-%	g		°C	
26. V. 1927									
Nüchtern v. d. Narkose		0		76	14,3				
	Tiefe Narkose + 100 Insulineinheiten subkutan								
1 Std. nach d. Insulininj.				60					
1. Injektionsstunde * .	50	4,23	0,252	284	43,9	0,63	I		
2. „ . .	99	9,03	0,538	345	39,0	1,16		38,8	Schüttelfrost
3. „ . .	115	10,42	0,620			1,33		38,9	
4. „ . .	124	10,66	0,635	364	36,7	1,32		39,0	
5. „ . .	100	9,61	0,572			1,64		39,0	
6. „ . .	119	8,02	0,477	279	32,7	1,74			
Durchschnitt:			0,516						
7. Injektionsstunde. .	115	6,40	0,381			1,66	II		Schüttelfrost
8. „ . .	125	6,77	0,403	264	32,7	1,64		39,1	
9. „ . .	145	5,86	0,349			1,64			
10. „ . .	113	5,06	0,301	269	32,2	1,69		39,4	
11. „ . .	105	7,07	0,422			1,65			
12. „ . .	135	5,92	0,351	242	37,5	1,72		39,4	
Durchschnitt:			0,368						

* Glykoseinfusion begann eine Stunde nach der Insulininjektion.

während der Narkose studiert worden ist, erinnern die Zuckerkurven sehr an die normalen Kurven bei demselben Tiere (vgl. IV. Mitteilung. Tabelle XI), also ohne Narkose und ohne Insulin. Sie sind nämlich ausgesprochen zweiphasig: in den ersten 6 Stunden scheidet das Tier durchschnittlich 0,516 g/kg aus, in den zweiten 6 Stunden 0,368 g/kg Glykose. Die Versuche aus der IV. Mitteilung, Tabelle XI und XII und in dieser Abhandlung Tabelle V und VI bilden eine Serie, die

an demselben Tiere unter Einhaltung gleichförmiger Bedingungen in wöchentlichen Abständen ausgeführt worden sind[1].

Hündin Nr. 9.

Versuch Nr.	Zeit 1927	Das Tier verweilt im Laboratorium Tage	Glykose injiziert pro kg und Std. g	Glykose ausgeschieden pro kg und Std. g	Die ausgeschiedene Menge ist im Verhältnis zur injizierten %	Blutzucker durchschnittlich mg-%		Bemerkungen
3	4. V.	41	2,00	0,263	13,2	276	ohne Narkose	ohne Insulin
4	11. V.	48	2,00	0,165	8,3	241		100 E. Insulin
5	19. V.	55	2,00	0,436	21,8	316	währ. d. Narkose	ohne Insulin
6	26. V.	61	2,00	0,433	21,7	292		100 „ „

Ohne Narkose hat die Insulineinspritzung einen bedeutenden Einfluß auf die Glykosurie und Glykämie gehabt, dagegen war während der Narkose der Einfluß, soweit er überhaupt vorhanden war, minimal, da die Glykosurie nicht abnahm und nur der Blutzucker eine im ganzen sehr geringe Senkung aufwies. In diesem Narkoseversuch hatte aber das Insulin schon vor der Zuckerinjektion einen geringeren hypoglykämischen Einfluß ausgeübt, als im entsprechenden Versuch ohne Narkose.

Nach dem Abschluß der Zuckerinjektion gehen zuweilen geringe Glykosemengen in den Harn über, aber nur, wenn die Glykosurie während der Zuckerinjektion in bedeutendem Maße hervortritt (sie erscheinen nicht, wenn die Glykosurie sehr gering ist). Diese Menge ist größer während der Narkose, z. B. Hündin Nr. 3 hat ohne Narkose 0,23 g und mit Narkose 0,72 g ausgeschieden.

Bisher haben wir die Form der Zuckerkurven betrachtet. In der Tabelle VII können wir den Einfluß der Amytal-Narkose auf die *assimilative Geschwindigkeit* (1) beobachten. Es geht aus dieser Tabelle klar hervor, daß die Narkose in allen Versuchen die assimilative Fähigkeit der Tiere beeinträchtigt hat, ohne Rücksicht auf die Assimilationsform, daß die Spannweite der Reaktion bei verschiedenen Tieren groß ist, so, daß dieselben Zahlen, die für das eine Tier schon eine große Beeinträchtigung der Glykoseassimilation bedeuten, für das andere Tier die Norm sein können. Alle Zuckerkurven wurden durch die Narkose auf ein höheres Niveau gehoben.

[1] Es läßt sich nicht sagen, inwieweit das „Käfigleben" Einfluß auf diese Versuche haben konnte [vgl. (1)].



Tabelle VII.

Das Verhältnis der Glykosurie zur Glykämie ohne und während der Narkose bei intravenöser Glykosedauerinjektion.

Hündin	Laufende Nr. des Versuchs		Reaktionstypus	Aufenthalt im Laboratorium		Injektionsgeschwindigkeit pro kg und Std.	Versuchsdauer	Durchschnittliche Glykosurie (durchschn. Exkretionsgeschwindigk.)				Durchschnittl. Blutzuckermenge		Durchschn. assimilat. Geschwindigkeit *	
								ohne Narkose		währ. d. Narkose					
	ohne Narkose	während der Narkose		Versuch ohne Narkose	Versuch mit Narkose			Menge pro g und Std.	% der injiziert. Menge	Menge pro kg und Std.	% der injiziert. Menge	ohne Narkose	während der Narkose	ohne Narkose pro kg und Std.	während der Narkose pro kg und Std.
Nr.				Tage	Tage	g	Std.	g		g		mg-%	mg-%	g	g
10	1	2	Assimilativ, platt	29	42	2,00	5	0,037	1,9	0,283	15,2	185	276	1,96	1,72
6	2	2	Assimilativ, zweiphasig	14	14	2,00	5	0,033	1,7	0,103	5,2	228	248	1,97	1,90
12	1	3	Assimilativ, zweiphasig	26	40	2,00	11	0,088	4,4	0,139	7,0	233	253	1,91	1,86
7	3	4	Übergangsform	35	42	2,00	6	0,160	8,0	0,393	18,7	215	292	1,84	1,61
5	1	2	Subassimilativ, platt	45	49	2,00	8	0,169	8,5	0,402	20,1	279	382	1,83	1,60
9	3	5	Subassimilativ, zweiphasig	41	56	2,00	12	0,263	13,2	0,436	21,8	276	316	1,74	1,56
3	1	2	Subassimilativ, ansteigend	30	35	2,00	8	0,248	12,4	0,376	18,8	303	303	1,75	1,62
3	5	6	Subassimilativ, ansteigend	63	75	2,00	8	0,340	17,0	0,466	23,3	319	332	1,66	1,53
			Durchschnittlich:	35	44	2,00	8	0,168	8,4	0,325	15,6	255	300	1,83	1,68

* Berechnet in diesem Falle durch Subtraktion der durchschnittlichen Extraktionsgeschwindigkeit von der Injektionsgeschwindigkeit ohne Rücksicht auf die Blutzuckerhöhe. Sonst wurde die assimilative Geschwindigkeit nach der Formel, die in (1) angegeben wurde, berechnet.

In der Tabelle VIII ist ein Kontrollversuch angeführt, der zeigt, wie die Reaktion eines während der Narkose sterbenden Hundes aussieht. In dieser Tabelle fällt zunächst die fortwährend und gewaltig ansteigende Blutzuckerkurve auf, die eine Höhe von 1567 in der 13. Versuchsstunde erreicht. Bis zur fünften Stunde ist die Niere noch imstande, die Zuckerexkretion durch vermehrte Diurese einzuholen, von der sechsten Stunde an aber vermindert sich die Diurese stufenweise und mit ihr auch die Glykosurie. Die Feinheiten des assimilativen Mechanismus werden hier zerstört. Keiner der oben angeführten Versuche war agonal, im Gegenteil nach allen lebten die Tiere, und nach fast allen erholten sie sich wieder vollkommen.

Tabelle VIII.

Hündin Nr. 8, Versuch 3. Körpergewicht 11,1 kg. Graviditätsüberdosierung mit Amytal. Pseudo-zweiphasige Reaktion. Narkose mit tödlichem Ausgang.

	Harn			Blut		Rektaltemperatur	Bemerkungen
	Menge	Glykose gefunden	Glykose pro kg	Zucker	Milchsäure		
	ccm	g	g	mg-%	mg-%	°C	
30. III. 1927 Nüchtern v. d. Narkose		0		84	13,5		
	Tiefe Narkose						
1. Injektionsstunde . .	24	0,86	0,077	412	21,4	38,0	Cheyne-Stokessches Atmen bis zu Ende
2. „ . .	45	3,33	0,300			37,6	
3. „ . .	80	5,77	0,520	562	21,8	35,8	Kein Schüttelfrost
4. „ . .	85	6,03	0,543				Kein Cornealreflex
5. „ . .	124	8,76	0,789	605	25,3	36,4	
6. „ . .	69	5,61	0,448			36,5	
7. „ . .	59	5,01	0,451	719		37,1	
8. „ . .	53	4,26	0,384				
9. „ . .	58	4,80	0,432	805		37,0	
10. „ . .	25	1,95	0,176			37,3	
11. „ . .	35	2,35	0,212	935		37,2	
12. „ . .	26	1,44	0,130			37,0	
13. „ . .	12	0,64	0,058	1567			

Die Hündin verendete 16 Minuten nach Beendigung des Versuchs.

Die *Blutmilchsäurewerte* und *-kurve* bei intravenöser Traubenzuckerinjektion während der Narkose zeigten keine Abweichungen von denselben in Injektionsversuchen ohne Narkose (1). Der Anstieg der Werte beträgt 52 bis 203% über den Anfangsspiegel, was in absoluten Zahlen 7,7 bis 30,7 mg-% bedeutet. Die Kurve erreicht meist ihren Gipfel in der zweiten und dritten Injektionsstunde und hält sich auf diesem Niveau trotz der Schwankungen der Assimilation (Abb. 1 und 2, Tabelle II und III). Die Summation des Einflusses

der Zuckerinjektion und der Insulineinspritzung auf die Blutmilchsäure ist aus der Tabelle VI ersichtlich, wo Insulin 1 Stunde vor dem Beginn der Zuckerinfusion einverleibt wurde.

Besprechung und Zusammenfassung.

Obwohl ohne gleichzeitige Zuckerinjektion die Amytal-Narkose anscheinend den Zuckerstoffwechsel nicht beeinträchtigt, erfolgt doch während derselben bei gleichzeitiger Zuckerinjektion in jedem Falle eine bedeutende Störung der Assimilationsgeschwindigkeit. Damit bestätigen wir mit unseren 2 g Injektionsgeschwindigkeit die Untersuchungen von *Hines*, *Boyd* und *Leese* (5), die mit 4 g Geschwindigkeit ausgeführt wurden. In unseren Amytalversuchen war die Glykosurie um 7,2% der injizierten Menge höher, als in der entsprechenden Versuchsreihe ohne Narkose, der Blutzucker vermehrte sich durchschnittlich um 45 mg-%, die assimilative Geschwindigkeit verkleinerte sich durchschnittlich um 0,15 g Glykose pro Kilogramm und Stunde. In der angegebenen Versuchsreihe hat das Insulin, vor dem Beginn der Zuckerinfusion einverleibt, fast keinen Einfluß auf den Zuckerumsatz (vom Standpunkt der von uns angegebenen Forschungsmittel aus) gehabt. Wir wollen aber daraus keine Regel machen, da es wahrscheinlich von der Tiefe der Narkose abhängig ist, inwieweit der Insulineinfluß in solchen Versuchen beeinträchtigt wird.

Obwohl die Amytal-Narkose die Assimilationsgeschwindigkeit bedeutend beeinträchtigt, läßt sie doch in vielen Fällen mehr oder weniger *die spezielle Form der Zuckerkurven unbeeinflußt.* Besonders ist dies aus den Abb. 1 und 2 im Vergleich mit der Tabelle IV und Abb. 2 aus der IV. Mitteilung ersichtlich. Das bedeutet, daß die feinen assimilativen Einrichtungen, deren Ausdruck diese Formen der Zuckerkurven sind, gegen Amytal-Narkose resistent sind. Dabei bleiben auch die Milchsäurewerte im Blute, im Vergleich mit den Versuchen ohne Narkose, unverändert. Amytal eignet sich zur Hervorrufung einer langdauernden Narkose bei Anwendung einer entsprechenden Dosierung. Es ist bei Hündinnen in späten Graviditätsmonaten kontraindiziert.

Für das Amytal sind wir der Firma Eli Lilly and Comp., für das Insulin der Firma Chemische Fabrik auf Aktien (vorm. E. Schering) zu Dank verpflichtet.

Literatur.

1) *M. Wierzuchowski* und *H. Gadomska*, diese Zeitschr. **191**, 198, 1927. — 2) *H. J. Deuel jr.*, *W. H. Chambers* und *A. T. Milhorat*, Journ. of biol.Chem. **69**, 249, 1926. — 3) *D. J. Edwards* und *J. H. Page*, Amer. Journ. Physiol. **69**, 177, 1924. — 4) *R. Kuhn* und *H. Baur*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **141**, 68, 1924. — 5) *H. M. Hines*, *I. D. Boyd* und *C. E. Leese*, Amer. Journ. Physiol. **76**, 293, 1926.

Die Stickstoffverteilung im Pansen der Wiederkäuer bei Fütterung und Hunger und ihre Beziehung zu den Pansen-Infusorien.

Von

Ernst Mangold und **Constanze Schmitt-Krahmer.**

(Aus dem Tierphysiologischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule Berlin.)

(Eingegangen am 3. November 1927.)

Im Magen und Darm der Wiederkäuer und anderer Pflanzenfresser finden sich aus zwei Klassen von Mikroorganismen, Bakterien und Infusorien, zahlreiche Arten, die offenbar mit den Wirtstieren in Symbiose leben und für sie eine ernährungsphysiologische Bedeutung besitzen. Hinsichtlich der Bakterien sind wir durch eingehende Arbeiten über die wichtigsten Vorgänge ihrer besonders die pflanzliche Nahrung aufschließenden Tätigkeit in den Grundlagen bis zu einem gewissen Grade aufgeklärt.

Dagegen wissen wir noch kaum etwas über die ernährungsphysiologische Bedeutung der Infusorien des Verdauungskanals. Über ihren eigenen Stoffwechsel wissen wir sicher eigentlich nur, daß sie lebhaft Kohlehydrate umzusetzen und zu speichern vermögen, und daß sie auch grüne Pflanzenteile zersetzen, die für sie lebensnotwendig sind[1]. Welche Stoffe sie sonst auszunutzen und abzubauen imstande sind und woraus sie insbesondere ihr lebendiges Eiweiß aufbauen, ist noch nicht sicher festgestellt.

Die Frage hat neben der theoretischen auch praktische Bedeutung. Falls die Infusorien nicht auf pflanzliches Reineiweiß angewiesen sind, sondern ihr Körpereiweiß vorwiegend auch aus Amiden aufbauen können, so läge es nahe, durch Fütterung mit diesen die symbiontischen Infusorien bis zu einer solchen Menge anzureichern, daß sie selbst als Eiweißquelle für ihre Wirtstiere eine größere Bedeutung gewännen. Für die *Bakterien* ist diese Möglichkeit von *Zuntz, Hagemann, Morgen*

[1] *Trier*, Zeitschr. f. vergl. Physiol. 4, 305, 1926.

und anderen begründet worden; sie hat zu zahlreichen Versuchen über Amidfütterung geführt, ist aber noch nicht einwandfrei erwiesen[1].

Wieweit sie für die *Infusorien* des Magen-Darmkanals verwirklicht ist, liegt bisher noch keineswegs klar, obwohl schon 1843 von *Gruby* und *Delafond*[2] auf diese Bedeutung der Infusorien als Nährstoffquelle hingewiesen wurde.

Zweifellos gehen, trotz der „Unsterblichkeit" der Einzelligen, beim Weitertransport aus Pansen und Haube in den Psalter und Labmagen hinein, zahlreiche Infusorien zugrunde und werden vom Wirtstiere verdaut. Als eine beachtenswerte Eiweißquelle kann dies aber erst in Betracht kommen, wenn der Anteil des Infusorieneiweißes am gesamten Eiweiß des Vormageninhalts einen erheblichen Prozentgehalt erreicht. Wieviel dieser beträgt, hat unlängst *C. Schwarz*[3] am Rinderpansen festzustellen versucht.

Er fand hierbei an dem gesamten N-Gehalt des Panseninhalts den Bakterienstickstoff mit 11,7% und den Infusorien-N mit 20% beteiligt und berechnet hieraus für 100 kg Panseninhalt 2,79 kg Mikroorganismen mit 256 g Eiweiß. *Schwarz* hält es sogar für nicht unwahrscheinlich, daß der größte Teil des Eiweißbedarfs der Wiederkäuer auf dem Umwege über Mikroorganismen-Eiweiß gedeckt wird, und daß den Mikroorganismen „eine sehr erhebliche, wenn nicht die ausschlaggebende Bedeutung als Nahrungsquelle zukommt".

Scheunert[4], der schon vordem den Panseninfusorien keine wesentliche Bedeutung zuschrieb, hält auch nach diesen erstaunlichen Mitteilungen von *Schwarz* die Frage noch keineswegs für endgültig geklärt[5].

Im Rahmen anderer Untersuchungsreihen unseres Instituts über die Pansenverdauung bei Schafen schien es uns möglich, die Frage von einer neuen Seite her in Angriff zu nehmen, und zwar durch Untersuchung der Stickstoffverteilung im Panseninhalt bei normalem und bei infusorienfreiem Zustande. Letzterer läßt sich, wie wir uns anläßlich der Arbeit von *W. Meyer*[6] überzeugen konnten, leicht durch einige Hungertage beim Schafe erreichen. Bei täglicher Probeentnahme von Panseninhalt mittels der Schlundsonde mußte es daher möglich sein, durch Vergleich der Stickstofffraktionen im normal infusorienhaltigen, dann beim Hunger allmählich an Infusorien abnehmenden und schließlich infusorienfreien Panseninhalt und weiter bei erneuter

---

[1] Zusammenfassend siehe *Scheunert* und *Schieblich*, Handb. d. norm. u. pathol. Physiol. **3**, 989, 1926.

[2] Zit. nach *C. Schwarz*, diese Zeitschr. **156**, 130, 1925.

[3] *C. Schwarz*, ebendaselbst **156**, 130, 1925.

[4] *Scheunert*, Oppenheimers Handb. d. Biochem., Bd. 3, 2. Hälfte, S. 157, 1909.

[5] *Scheunert* und *Schieblich*, Handb. d. norm. u. pathol. Physiol. **3**, 990, 1927.

[6] *W. Meyer*, Zeitschr. f. vergl. Physiol. 1927. Bd. 6, S. 402.



ausreichender, aber infusorienfreier Fütterung gröbere Veränderungen in der Stickstoffverteilung zu erfassen, wenn die Infusorien quantitativ dabei wirklich eine so große, 20 %ige Rolle spielten.

Da hierbei die Fütterung genau reguliert und auch die Infusorienmenge täglich mikroskopisch kontrolliert werden konnte, schienen uns derartige Untersuchungen aussichtsvoll als Ergänzung zu den Versuchen von *Schwarz*, die sich auf die Analyse des Panseninhalts von zwölf frisch geschlachteten Rindern beschränkten, und wobei nur in drei Fällen versucht wurde, den Infusorien-N, als Grundlage für die oben erwähnten Schlußfolgerungen, zu bestimmen.

Methodik.

Schon rein methodisch gewährleistet die Entnahme von Panseninhalt vom lebenden Tiere, bei dem der Panseninhalt beständig bewegt und durchmischt wird, wohl sicherer die Erfassung einer Durchschnittsprobe, als die Entnahme am geschlachteten Tiere, da sich hier, wie wir aus eigenen Versuchen an frisch getöteten Schafen und Ziegen wissen, der Inhalt sofort in einen breiigen und einen dünnflüssigeren Anteil absetzt, und da in dickbreiigem oder dickflüssigem Panseninhalt stets prozentuell mehr Stickstoff (s. weiter unten S. 416) und übrigens auch weit mehr Infusorien enthalten sind als in dünnerflüssigem.

Nach den verdienstvollen Untersuchungen von *Stålfors*[1] an einer Kuh mit Pansenfistel finden sich auch schon beim lebenden Tiere in verschiedenen Tiefen des Panseninhalts derartige Unterschiede der Konsistenz und entsprechend auch chemische Differenzen, und besteht auch hier keine vollkommene gleichförmige Durchmischung des Panseninhalts.

Diese Fehlerquellen hat *Schwarz* vielleicht dadurch umgangen, daß er, soweit aus seinen kurzen Angaben ersichtlich ist, anscheinend den ganzen Panseninhalt entnahm und durchmischte und hiervon eine abgewogene Menge zur Analyse verwendete. Nach unseren Erfahrungen läßt sich hierbei aber wohl kaum vermeiden, daß sich dem Inhalt des aufgeschnittenen Pansens Blut beimischt und die Stickstoffwerte fehlerhaft verändert.

Daß wir bei der Probeentnahme mittels Schlundsonde brauchbare Durchschnittswerte erhielten, glauben wir aus der befriedigenden Übereinstimmung zwischen mehreren aufeinanderfolgend entnommenen Proben ersehen zu können; so enthielten z. B. drei derartige Proben vom gleichen Tiere 0,056 bzw. 0,050 und 0,051 % N; ein anderes Mal zwei Proben 0,198 und 0,200% N, und in einem weiteren Falle 0,293 bzw. 0,272 % N. Eine etwas größere Abweichung ergab sich einmal mit 0,041 und 0,029% N.

Unsere Versuche wurden im wesentlichen als Parallelversuche an zwei Hämmeln durchgeführt, die stets den gleichen Veränderungen ihres Fütterungszustandes unterworfen wurden, wobei mehrfach individuelle Unterschiede im Verhalten zutage traten. Um zunächst die normalen Werte kennenzulernen, wurden anfangs vier Hämmel nebeneinander untersucht.

[1] *Stålfors*, Arch. f. wiss. u. prakt. Tierheilkde. **54**, 518, 1926.



Bei der Aufarbeitung der einzelnen Pansenproben wurde folgendermaßen verfahren. Zunächst wurde ein Teil des entnommenen Panseninhalts dazu verwendet, um die Futterreste + Infusorien von den gelösten Stoffen zu trennen. Wir schlossen uns dabei der *Schwarz*schen Methodik an, indem die Pansenprobe reichlich mit *Wasser versetzt* (zehnfache Menge) und durch eine Nutsche mit mehrfacher Filterpapierlage gesaugt wurde, wobei die Filtration oft mehrere Stunden in Anspruch nahm, wenn der Panseninhalt von normal (Heu, Tränke) ernährten Tieren stammte. Die Proben von Hungertieren filtrieren bedeutend schneller. Sowohl in dem auf der Nutsche bleibenden Rückstand, der die Futterreste + Infusorien enthält, als auch in dem Filtrat, in dem außer den gelösten Stoffen sich auch der größte Teil der Bakterien befindet, wurde der Stickstoff nach *Kjeldahl* bestimmt. Außerdem wurde in einer besonderen Probe noch der Gesamtstickstoff festgestellt, während *Schwarz* diesen nur aus den einzelnen Teilbestimmungen durch Addition errechnete. Weiter wurde der Reinprotein-N nach *Barnstein* bestimmt und gleichzeitig im Filtrat davon der Amidstickstoff. Denn es hatte sich gezeigt, daß von derselben Pansenentnahme, besonders wenn sie dünnflüssig war, sich so schwer vollkommen gleichmäßige Proben abteilen ließen, daß eine einfache Errechnung des Amid-N aus *zwei verschiedenen Proben* (Gesamt-N, Reinprotein-N) uns zu unsicher erschien. Endlich fand in einigen Fällen noch die quantitative Bestimmung des beteiligten Bakterienstickstoffs, Aminostickstoffs und Ammoniaks im Panseninhalt statt.

Da es uns besonders darauf ankam, das Verhältnis der einzelnen N-Fraktionen bei Gegenwart der normalen und verringerten Infusorienmenge mit demjenigen bei völligem Fehlen derselben zu vergleichen, wurde in jeder Pansenprobe eine *mikroskopische Infusorienkontrolle* vorgenommen. Dies geschah stets in der gleichen Weise, indem dreimal aus dem umgeschüttelten Panseninhalt mit der Pipette ein gleich großer Tropfen auf den Objektträger gebracht und daraufhin durchgesehen wurde, ob sehr viele, viele, wenige oder nur vereinzelte Infusorien vorhanden waren. Im letzten Falle wurden sie ausgezählt und protokolliert, ob sie sich noch lebend oder tot vorfanden.

I. Normalwerte; Einfluß verschiedener Fütterung und der Nahrungsentziehung auf N-Gehalt und Konsistenz des Panseninhalts.

Um als Grundlage den normalen N-Gehalt im Pansen und seine Schwankungen kennenzulernen, wurde derselbe zunächst bei vier Hämmeln wiederholt bestimmt (Tabelle I). Die Tiere wurden dabei gemeinsam gefüttert und mit Heu und einer aus Gerstenschrot, Leinkuchenmehl und Wasser bestehenden Tränke normal ernährt. Die Pansenproben wurden stets vor der Morgenfütterung entnommen.

Die Tabelle I zeigt den Gesamt-N für die einzelnen Tiere und Tage und läßt bei A, B, D nur geringe, bei C größere Schwankungen dieses Wertes erkennen.

Die Durchschnittswerte für die vier in gleicher Weise gehaltenen Tiere weichen nicht sehr wesentlich voneinander ab; A, B, D stimmen fast genau überein (0,206 bis 0,231 % N).

Tabelle I.

Prozent N-Gehalt im Pansen der Schafe A, B, C, D bei normaler Ernährung.

Datum	A	B	C	D
12. XI. 1926	0,228 dünnflüssig	0,201 dünnflüssig	—	—
16. XI. 1926	0,201 dünnflüssig	0,182 dünnflüssig	0,349 dickflüssig	0,170 dünnflüssig
1. XII. 1926	0,208 dickflüssig	0,172 dünnflüssig	0,269 dickflüssig	—
11. XII. 1926	0,261 dickflüssig	0,240 dickflüssig	0,209 dünnflüssig	0,217 dünnflüssig
18. XII. 1926	0,260 dickflüssig	0,236 dickflüssig	0,315 dickflüssig	0,281 dickflüssig
Durchschnitt . . .	0,231	0,206	0,285	0,223

Die höheren Werte im Vergleich zu den von *Schwarz* für den Rinderpansen angegebenen erklären sich wohl daraus, daß seine Tiere nur minderwertiges Heu erhalten hatten, unsere dagegen neben vollwertigem Heu noch jene Tränke, die selbst etwa 0,4% N enthielt.

In welchen Grenzen dieser *Einfluß verschiedener Fütterung* auf den N-Gehalt im Pansen wirkt, ergab sich uns aus den zahlreichen weiteren Versuchen, die sämtlich mit den Schafen A und B angestellt wurden. Von diesen gibt Tabelle II eine Übersicht fortlaufend aneinandergereihter Versuchsperioden, teils im Durchschnittswert mehrerer Tage, teils in Einzelwerten. Sie zeigt, daß der Gesamt-N-Gehalt im Pansen im Hungerzustande schnell absinkt. Wenn er am siebenten Hungertage noch 0,05% beträgt und aus dem auch beim Hungertiere retinierten Panseninhalt überhaupt nicht ganz verschwindet, so beruht dies wohl auf dem ständigen, wenn auch spärlichen

Tabelle II.

Prozent N-Gehalt im Pansen bei verschiedener Fütterung und Hunger.

Fütterungsart	Schaf A	Schaf B
1. Vorversuche. Heu und Tränke	0,231	0,206
2. 8. Tag: Heu und Tränke	0,231	0,210
3. 1. Hungertag	0,121	0,129
4. 4. Hungertag	0,052	0,117
5. 7. Hungertag	0,052	0,035
6. 4 Tage Tränke	0,335	0,237
7. 5 Tage Gerstenschrot + Leinkuchenmehl + Wasser	0,439	0,387
8. 17 Tage Heu und Tränke	0,237	0,267
9. 8 Tage Heu und Tränke	0,245	0,250
10. 1. Hungertag	0,140	0,153
11. 4. Hungertag	0,072	0,096
12. 7. Hungertag	0,050	0,056

Zuflusse von den Speichel- und Schleimdrüsen der oberen Teile des Verdauungskanals.

Die Tabelle II zeigt weiter, daß der N-Gehalt größer ist, wenn nur die aus Gerstenschrot, Leinkuchenmehl und Wasser bereitete Tränke gegeben wird (Reihe 6), als bei Heu- + Tränkefütterung (Reihe 1, 2, 8, 9), und daß er noch größer wird, wenn Wasser und Gerstenschrot und Leinkuchenmehl unangerührt gegeben werden (Reihe 7). Wenn, wie es in einem anderen Versuch geschah, die Tränke fortgelassen und nur Heu gegeben wurde, sank der N-Gehalt sofort ab.

Die Tabelle II zeigt ferner, daß zwei Schafe auch bei gemeinsamer und völlig gleichartiger Ernährung zwar im allgemeinen gleichsinnige Veränderungen des Pansen-N erfahren, doch aber nicht zu absolut gleichen Werten gelangen. So überwiegen die N-Zahlen bei Schaf A in den ersten sieben Reihen der Tabelle deutlich, während sie in den letzten fünf Reihen mit geringem Zurückbleiben praktisch gleich sind mit denen von B.

Daß der *N-Gehalt im Pansen mit der Konsistenz wechselt,* zeigte schon Tabelle I, nach der sich für die dickflüssigen Proben aller Tiere im Durchschnitt 0,268, für die dünnflüssigen 0,197% N ergibt. Für Schaf A und B zusammengenommen waren die entsprechenden Durchschnittswerte dabei 0,241 und 0,197 % N; in dem Versuch der Tabelle II, Reihe 7, waren die Durchschnittswerte für dick- und dünnflüssig 0,441 bzw. 0,302% N. Auch unabhängig von der Wasseraufnahme ergab sich in allen anderen Versuchen ausnahmslos dasselbe und ebenso auch bei alleiniger Tränkefütterung. (So betrugen die Werte im Versuch der Tabelle II, Reihe 6, durchschnittlich für dickflüssig 0,35, für dünnflüssig 0,22% N.) Analoge Resultate erhielten wir ferner auch bei zwei Ziegen, deren Futter aus Heu, Weizen und Wasser ad libitum bestand. Der dickflüssige Panseninhalt enthielt im Durchschnitt 0,262% N, der dünnflüssige dagegen nur 0,199 % N.

Bei diesem parallel gehenden Wechsel der Konsistenz und des N-Gehalts ist, sofern keine beliebige Wasseraufnahme stattfindet, offenbar ein quantitativ wechselndes Abpressen von Flüssigkeit aus Pansen und Haube in Psalter und Labmagen beteiligt.

Am meisten dickflüssig, breiig war der Panseninhalt in dem am längsten mit Heu- und Tränkefütterung durchgeführten Versuch (Tabelle II, Reihe 8 und 9).

Am dünnflüssigsten erwies er sich stets im ***Hungerversuch*** bei völliger Futter- und Wasserenthaltung. Obwohl man annehmen sollte, daß die Magenflüssigkeit als Wasserdepot allmählich aufgebraucht würde, scheint im Gegenteil dabei eine Wasserretention im Magen stattzufinden. Über diese Verhältnisse ist beim Wiederkäuer nichts Näheres bekannt.

II. Der Gesamt-Stickstoffgehalt im Pansen mit und ohne Infusorien.

Die *Hungerversuche* waren uns deshalb wichtig, weil es durch sie gelingt, den Pansen von Infusorien zu befreien. Am dritten Tage eines ersten Hungerversuchs waren bei beiden Schafen nur noch wenige, meist tote Infusorien zu finden. Sie vermehrten sich aber in 8 Tagen wieder bis zu ziemlich normaler Anreicherung. Nach drei neuen Hungertagen waren wieder nur einige lebende und tote Infusorien übrig. Nach 14 Tagen normaler Heu- und Tränkenahrung konnten dann wieder „sehr viele" Infusorien festgestellt werden, die beim dritten Hungerversuch in 3 Tagen ebenso bis auf einige lebende und sonst nur (bei B auch nur wenige) tote verschwanden. Am vierten Tage waren sie stets bis auf ganz vereinzelte tote, am siebenten Tage des dritten Versuchs so gut wie vollkommen beseitigt.

Ein *Vergleich zwischen Hungerversuchen mit und ohne Infusorien* hätte nun einen typisch verschiedenen Verlauf hinsichtlich des Pansen-N erwarten lassen; wenn wirklich die Infusorien, entsprechend *Schwarz'* Angaben, sich mit 20 % am Gesamt-N des Pansens beteiligten, so mußte im Hungerversuch bei anfangs vorhandenen Infusorien der Gesamt-N des Pansens nicht nur um die gleiche Menge abnehmen wie bei schon anfangs fehlenden Infusorien, sondern auch noch um den N-Betrag der verschwindenden Infusorien selbst. Da auch in neueren Untersuchungen des Instituts (*Ferber*) bei sorgfältigster mikroskopischer Kontrolle keine Auflösungsstadien von Infusorien im Pansen gefunden wurden, die auf bakterielle Zersetzung hindeuteten, so verlassen offenbar die verhungerten Infusorien unzersetzt Pansen und Haube, um erst im Labmagen verdaut zu werden. Die Tabelle III zeigt nun, daß sich jene an *Schwarz* anknüpfende Erwartung nicht erfüllte. Bis zum dritten Hungertage, an dem, wie erwähnt, nur noch wenige tote Infusorien angetroffen wurden, sank gerade im ersten Versuch, bei dem die Infusorienzahl anfangs sicher noch am vollständigsten auf der normalen Höhe stand, der Gesamt-N nur bis auf 66 bzw. 61 % des vom letzten Fütterungstage her bekannten Anfangs-N-Gehalts, während dies im vierten Versuch, ohne Infusorien, sogar bis zu 50 bzw. 58% geschah.

Für einen merklichen Einfluß der Infusorien ließen sich höchstens die bei Schaf A im dritten Versuch gefundenen Werte (vgl. Tabelle III a, Versuch 3 und 4, und Tabelle III b, Versuch 3 und 4) anführen. Doch zeigt sich das Verhältnis bei Schaf B bis zum dritten Hungertage indifferent (Tabelle III a, Versuch 3 und 4) und bis zum vierten Hungertage (Tabelle III b, Versuch 3 und 4) sogar schon umgekehrt zuungunsten der Infusorienhypothese. Auch bleibt das scheinbar für den Einfluß der Infusorien sprechende Verhältnis dann bei Schaf A und B weiter bestehen bis zum siebenten Hungertage (vgl. Tabelle III c, Versuch 3

Tabelle III.

Hungerversuche mit und ohne Infusorien.

Versuch Nr.	Hungerversuche	Schaf A	Schaf B
a) Abnahme des N-Gehalts bis zum 3. Hungertage bis auf wieviel % des Anfangs-N-Gehalts.			
1	Mit Infusorien	66,6	61,79
2	„ „	58,20	61,45
3	„ „	37,22	53,80
4	Ohne „	50,25	58,21
b) Bis zum 4. Hungertage.			
3	Mit Infusorien	22,25	55,7
4	Ohne „	36,9	45,0
c) Bis zum 7. Hungertage.			
3	Mit Infusorien	22,25	16,66
4	Ohne „	25,64	26,29

und 4), obwohl hierbei zwischen dem vierten und siebenten Hungertage die bereits am vierten Hungertage nachweislich völlig verschwundenen Infusorien überhaupt gar keine Rolle mehr spielen können.

Die erwartete Bestätigung eines bemerkenswerten Anteils des Infusorien-N am Gesamt-Pansen-N, der bei den angenommenen 20 % wohl auch in diesen Versuchen immerhin hätte zur Geltung kommen müssen, blieb also aus. ***An dem Sinken des N-Gehalts im Hungerpansen ist der N der dabei verschwindenden Infusorien nicht in bemerkbarem Maße beteiligt.***

III. Die Verteilung des Pansenstickstoffs auf die einzelnen Fraktionen.

In diesen soeben bereits behandelten Versuchen an den beiden Schafen A und B wurde nun stets, in ähnlicher Weise wie bei *Schwarz*, der N-Gehalt im Pansen in verschiedene Fraktionen aufgeteilt, um wieder bei Gegenwart und bei Fehlen der Infusorien typische Unterschiede zu finden, die die Annahme einer bemerkenswerten Beteiligung des Infusorien-N am Gesamt-Pansen-N hätten rechtfertigen können.

Wenn wir den N-Gehalt der verschiedenen Fraktionen:

1. Futterreste + Infusorien,
2. gelöste Stoffe (Amide + lösliches Eiweiß) + Bakterien,
3. Gesamt-Reineiweiß-N,
4. Gesamt-Amid-N,

in ihrem Verhältnis zueinander und zum Gesamt-N des Panseninhalts vergleichen, müßten die durch das Infusorieneiweiß bedingten Unter-

schiede bei Gegenwart und Fehlen der Infusorien wohl feststellbar sein. Wir können hier aus dem großen Material an Einzelanalysen, Prozentberechnungen und Verhältniszahlen nur das hervorheben, was für oder gegen solche Unterschiede spricht.

So hätte man erwarten können, daß sich *der Anteil des N der Futterreste + Infusorien am Gesamt-N* beim Verschwinden der Infusorien im Hungerversuch ändern und zwar verringern würde, indem dann die gelösten Stoffe + Bakterien verhältnismäßig mehr hervortreten würden. Tatsächlich sank aber jener Anteil im zweiten Hungerversuch in den ersten 3 Tagen bei Schaf A von 79 nur auf 75%, hielt hier also die Zufallsgrenzen ein; bei Schaf B aber *stieg* er gleichzeitig von 70 auf 81%. Im dritten Hungerversuch sank er bei A während des Verschwindens der Infusorien innerhalb der ersten 4 Tage von 82 auf 60% und hielt sich dann die weiteren 3 Tage auf 60 bzw. 59%; bei B aber *stieg* er zugleich in 4 Tagen von 80 auf 92 und hielt sich weiter auf 97 bzw. 88%. Er sank aber auch in dem vierten, *infusorienfreien* Hungerversuch in 4 Tagen bei A von 84 bis 66% und bis zum siebenten Tage weiter auf 56% und schwankte bei B von 79% aus um die gleiche Höhe, um erst in den letzten Tagen ebenfalls noch weiter bis auf 64% zu sinken.

Die Analysen lassen also keinen Einfluß des Infusorien-N erkennen. Diese Prozentberechnungen ergaben übrigens auch während längerer gleichmäßiger Fütterungsperiode am infusorienfreien Tiere Schwankungen, die zwar bei Schaf A in viel engeren Grenzen blieben (z. B. in dem Fütterungsversuch Nr. 6 der Tabelle II zwischen 68 und 78% N, im Versuch Nr. 7 zwischen 80 und 91, im Versuch Nr. 8 zwischen 70 und 96%) und sich bei B teils ähnlich verhielten, teils aber ganz unerklärliche sprunghafte Schwankungen zeigten (z. B. in dem entsprechenden Versuche Nr. 6 zwischen 50 und 86, in Versuch Nr. 7 zwischen 74 und 97, in Versuch Nr. 8 zwischen 43 und 89%).

Ebensowenig ließ die fortlaufende Berechnung des *Verhältnisses zwischen dem N der Amide + lösliches Eiweiß + Bakterien zu dem N der Futterreste + Infusorien* irgendwelche Veränderungen erkennen, die zugunsten der Infusorienhypothese gesprochen hätten, da dieses Verhältnis sich, wie zu erwarten, ganz entsprechend den eben erwähnten Prozentberechnungen änderte.

Man hätte ferner erwarten können, den *Anteil des Reineiweiß-N am Gesamt-N* durch Gegenwart oder Fehlen der Infusorien beeinflußt und zwar durch letzteres herabgesetzt zu sehen. Durch Verschwinden der Infusorien mußte, wenn *Schwarz'* Angaben zutreffen, 20% Infusorien-N, also Reineiweiß-N, verlorengehen und dadurch die Amidfraktion relativ ansteigen.



Dieser Anteil sank aber im ersten Hungerversuch, gleichzeitig mit dem Verschwinden der Infusorien, nur von 91 auf 88 % bei Schaf A und bei B von 91 auf 87 %; im zweiten Hungerversuch von 90 auf 86 bzw. von 89 auf 81 %; etwas beträchtlicher im dritten, und zwar von 93 auf 79 bzw. von 91 auf 72 %; in diesem dritten Hungerversuch stieg er aber gerade *nach* dem Verschwinden der Infusorien auch wieder etwas an, bei A von 79 auf 83, bei B von 72 auf 93 %.

Man könnte nun geltend machen, daß beim Hungern auch die absolute Menge der Amide selbst im Mageninhalt abnehmen muß, und hierdurch das Verschwinden des 20 %igen Infusorien-N-Anteils am Gesamt-N verschleiert wird und in der Verhältniszahl Reineiweiß-N : Gesamt-N daher nicht zum Ausdruck kommt bzw. nur zu jenem geringen Sinken Anlaß gibt. Will man aber wenigstens dieses geringe Sinken auf die Infusorien beziehen, dann müßte die genannte Verhältniszahl im Hungerversuch, in dem von vornherein keine Infusorien da sind, völlig gleichbleiben. Dies war aber keineswegs der Fall; denn auch in dem *infusorienfreien* Hungerversuch (Tabelle III, Versuch 4) sank der prozentige Anteil des Reineiweiß-N am Gesamt-N binnen 4 Tagen in gleicher Weise, bei A von 90 auf 79 und bei B von 89 auf 83, und weiter bis auf 76 bzw. 79 %.

Auch die Veränderungen des Verhältnisses Reineiweiß-N : Gesamt-N lassen sich also nicht auf Infusorien beziehen. Vielmehr spricht das Ausbleiben von irgendwie erheblichen, dieses Verhältnis betreffenden Unterschieden zwischen den Hungerversuchen *mit und denjenigen ohne Infusorien* dagegen, daß dem Infusorieneiweiß-N ein irgendwie beachtlicher Anteil am Gesamt-N des Panseninhalts zukäme.

Es sei noch bemerkt, daß bei längeren gleichmäßigen Fütterungsperioden am infusorienfreien Tier gerade die zuletzt besprochene Verhältniszahl im allgemeinen nur sehr geringe Schwankungen und eine bemerkenswerte Konstanz aufweist. So änderte sie sich z. B. in dem Versuch 7 der Tabelle II in 5 Tagen bei A nur zwischen 87 und 98, bei B nur zwischen 93 und 98 %, und in Versuch 8 sogar innerhalb 17 Tagen bei A nur zwischen 91 und 96, bei B zwischen 90 und 94 %. Diese Zahlen zeigen zugleich, daß auch bei Fehlen der Infusorien ein sehr hoher Reineiweißgehalt am Gesamt-N des Panseninhalts beteiligt ist, daß auch dieser also nicht ohne weiteres auf vorhandenes Infusorieneiweiß schließen läßt.

Weiter haben wir auch noch besonders das *Verhältnis des analytisch bestimmten Amid-N zum Reineiweiß-N* in Betracht gezogen, obgleich dieses ja auch schon aus der soeben besprochenen Verhältniszahl hervorgeht; daher ergab sich dann auch aus dieser Kontrolle nichts Neues für die Infusorienfrage.

Bestimmung des Bakterien-N, Amino-N und Ammoniaks.

11 Wochen nach Abschluß der oben beschriebenen Versuche wurde bei Hammel A und B, die stets Heu und Tränke erhielten und deren Infusorienzahl und -arten wieder durchaus normalen Verhältnissen entsprachen, erneut Panseninhalt entnommen, und zwar bei jedem Tiere fünfmal innerhalb von 4 Wochen. Bei diesen Versuchen sollte noch die Bestimmung des Bakterien-N, Amino-N und Ammoniaks im Panseninhalt durchgeführt werden. Die nebenher, analog den früheren Versuchen ausgeführten Stickstoffbestimmungen brachten in den einzelnen Fraktionen nichts Neues. Was nun die Bakterien anbelangt, so wurde ihre N-Menge bestimmt, indem von dem Filtrat des Panseninhalts zunächst ein Teil auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und nach *Kjeldahl* auf N analysiert wurde, der Rest aber erst, nachdem er durch ein Berkefeldfilter geschickt worden war. Es ist dazu bemerken, daß im Filtrat der Fraktion Futterreste + Infusorien mikroskopisch noch stets einzelne Futterpartikeln zu finden sind, die natürlich dann auch durch das Bakterienfilter zurückgehalten werden. Umgekehrt werden sehr wahrscheinlich einige Bakterien auf der Nutsche zurückbleiben, daher kann, wenn auch beide Fehlerquellen einander bis zu einem gewissen Grade kompensieren mögen, der auf Bakterien-N berechnete Wert nur als ein Annäherungswert angesehen werden. Dieser Bakterien-N berechnete sich nun nach unseren Versuchen bei Hammel A zu 5 bis 9 %, bei Hammel B zu 11 bis 16% des Gesamtstickstoffs. Im Durchschnitt ergibt sich 10 % Bakterienstickstoff. Wir gelangten hier also zu einer guten Übereinstimmung mit *Schwarz*, der nach derselben Methodik im Rinderpansen 8,1 bis 17,5 %, im Durchschnitt 11,7 % Bakterien-N gefunden hatte.

Das Filtrat der Reinproteinfraktion, welches keine Bakterien mehr enthält, da diese mit dem Reinprotein zusammen ausgefällt werden, wurde zur Bestimmung des formoltitrierbaren Stickstoffs nach *Henriques-Sörensen* benutzt; diese führte aber, ebenso wie bei *Schwarz*, zu einem negativen Ergebnis. Auch nach der Methode von *Willstätter* und *Waldschmidt-Leitz*[1] ließen sich keine außerhalb der Fehlergrenze liegenden Mengen Aminostickstoff feststellen, so daß es sich jedenfalls nur um Spuren handeln könnte.

Schließlich wurden im frischen Panseninhalt noch Ammoniakbestimmungen nach *Krüger-Reich-Schittenhelm* ausgeführt. Während *Schwarz* kein Ammoniak nachweisen konnte, fanden wir nach derselben Methode für beide Tiere recht konstante Werte, im Durchschnitt 0,048 g NH_3 in 100 g Panseninhalt (bei Schaf A 0,043 bis 0,045 %, bei B 0,049 bis 0,052 %).

Zusammenfassung.

Die Versuche liefern einen Beitrag zur Frage nach der Beteiligung der Mikroorganismen als Eiweißquelle an der Ernährung der Wiederkäuer. Der Anteil des Bakterien-N am Gesamt-N des Panseninhalts von normal ernährten Schafen betrug 10% (*Schwarz* fand im Rinderpansen 11,7 %).

[1] *R. Willstätter* und *E. Waldschmidt-Leitz*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **54**, 2, 1921, Nr. 2988.



Hinsichtlich des Anteils der Panseninfusorien am Gesamtpansen-N (*Schwarz* gibt 20% an) ergaben die Versuche nur eine unwesentliche Beteiligung. Die Vergleichung der N-Abnahme im Pansen während der ersten Tage eines Hungerversuchs, einerseits beim infusorienfreien Schaf (bei dem durch früheres Hungern die Panseninfusorien zum Verschwinden gebracht waren) und andererseits beim normalen Schaf, bei dem die Infusorien in den ersten Tagen des Hungerversuchs verschwinden, ergab bei letzterem nicht die erwartete 20%ige Mehrabnahme des Pansen-N gegenüber dem ersteren.

Auch die Aufteilung des N-Gehalts im Pansen auf die einzelnen Fraktionen (Reineiweiß, sogenannte Amide usw.) lieferte keine Anhaltspunkte für einen beträchtlicheren Anteil des Infusorien-N am Gesamt-N.

Der Gesamt-N in Prozenten des Panseninhalts beträgt bei normal ernährten Schafen 0,2 bis 0,3%, ist bei dickflüssiger Konsistenz höher als bei dünnflüssiger, wechselt mit der Ernährung, indem er durch Kraftfutter zu-, durch Heufütterung abnimmt, und sinkt besonders rasch durch Hungern ab, so daß er nach 7 Hungertagen 0,05% beträgt.

Formoltitrierbarer N konnte im Panseninhalt nicht nachgewiesen werden, wohl aber NH_3.

Über chronische Methylalkoholvergiftung.

Von

Alfred Leo.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Breslau, Direktor: Geh. Rat *Pohl.*)

(Eingegangen am 3. November 1927.)

Durch die Untersuchungen von *Pringsheim*[1] erscheint der Mechanismus der Gewöhnung an den Äthylalkohol wenigstens teilweise geklärt: der chronisch vergiftete Organismus verbrennt den Äthylalkohol schneller als der normale (in etwa zwei Drittel der Zeit), während die ausgeschiedenen Mengen in Harn, Kot und exhalierter Luft kaum eine Änderung erfahren. Zugleich werden — wie es den Anschein hat — neue Stätten (z. B. der Herzmuskel) zum Zwecke der Alkoholverbrennung herangezogen.

Die Gewöhnung an den Äthylalkohol ist jedoch keineswegs eine spezifische. *Rudolf A. P. Rosenfeld*[2] konnte zeigen, daß mit Methylalkohol vorbehandelte Tiere (Kaninchen) auf sonst schwer toxische Dosen von Äthylalkohol weniger stark reagieren, während umgekehrt aus einer Arbeit von *Asser*[3] hervorgeht, daß mit hohen Dosen von Äthyl- und Amylalkohol gefütterte Hunde Methylalkohol anders und wahrscheinlich vollständiger verbrennen; jedenfalls sank bei so vorbehandelten Tieren die Ausscheidung der Ameisensäure (bekanntlich ein Zwischenprodukt bei der CH_3OH-Oxydation) auf ein Drittel des Normalwertes. Chronische Vergiftungsversuche mit Methylalkohol an Ratten (*Sollmann*[4]), an Kaninchen (*Rost* und *Braun*[5]) geben für die Frage der Gewöhnung an diese Substanz keine Anhaltspunkte.

Unsere Kenntnis bezüglich der Wirkung des CH_3OH bei lange fortgesetzter Darreichung an Hunden beschränkt sich im Grunde auf eine einzige Angabe aus dem Jahre 1892, nämlich aus der Arbeit *Pohls*[6] „Über die Oxydation des Methyl- und Äthylalkohols im Tierkörper", in der zum ersten Male das Auftreten der Ameisensäure im Harn als Zwischenprodukt bei der CH_3OH-Oxydation nachgewiesen wurde. „Dagegen gelang es mir niemals, so schreibt *Pohl*, Hunde bei Zufuhr von Methylalkohol, wenn die Dosen auch nicht größer als 15 bis 20 ccm waren und in zweitägigen Intervallen gegeben wurden, länger als einige Tage am Leben zu erhalten. Die Tiere lagen

---

[1] Diese Zeitschr. **12**, 143, 1908.
[2] Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exper. Therap. **21**, 228, 1914.
[3] Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Therap. **15**, 325, 1914.
[4] Journ. of pharm. a. exper. therap. **16**, 291, 1920.
[5] Arbeiten aus dem Reichgesundheitsamt **57**, 580.
[6] Arch. f. exper. Pathol. u. Therap. **31**, 281, 1893; diese Zeitschr. **127**, 66, 1922.



gewöhnlich tagelang komatös da, erwachten kaum aus dem Schlafzustand, fraßen nichts und gingen, auch wenn man mit der Alkoholzufuhr abbrach, zugrunde. Als einziger, regelmäßiger Sektionsbefund ist eine intensive Verfettung der Leber anzuführen, deren Einzelheiten mit den Befunden *Kahldens* sehr gut übereinstimmten." Indessen liegt es auf der Hand, daß diese relativ allgemein gehaltenen Angaben — zumal bei Fehlen näherer Daten über das Gewicht der zur Verwendung gelangten Tiere, der gewählten Alkoholkonzentration usw. — nicht geeignet sind, die Frage der Möglichkeit einer chronischen Vergiftung mit Methylalkohol als im negativen Sinne entschieden erscheinen zu lassen. Vor allem schließen sie nicht aus, daß es bei anderer Versuchsanordnung (Einschleichen mit kleinsten Dosen, die keine oder nur ganz geringe Symptome machen) nicht doch möglich sei, Gewöhnung an größere und das Bild einer chronischen Vergiftung zu erzeugen. Vielleicht, daß frühere Untersucher von der Bearbeitung dieses Problems *der* Umstand zurückgeschreckt haben mag, daß gerade hier die Versuchstierfrage von geradezu ausschlaggebender Bedeutung ist (Kaninchen z. B. eignen sich infolge sehr ausgesprochener und anscheinend völlig ungesetzmäßiger Überempfindlichkeit gegen CH_3OH überhaupt nicht. Vgl. *R. Rosenfeld* und *Krol*[1]).

Die hier bestehende Lücke auszufüllen, übernahm ich.

Zwei Fragestellungen leiteten uns bei unseren unten mitzuteilenden Versuchen:

I. Läßt sich eine chronische Vergiftung bzw. Gewöhnung an CH_3OH erzeugen?

II. Wie ist der Mechanismus einer solchen Gewöhnung?

Eine derartige Untersuchung ist um so wichtiger, als in der allerletzten Zeit durch *Neuberg* und *Ottenstein*[2] der Nachweis geringer Mengen von Methylalkohol im Tabakrauch erbracht ist, und auch die Möglichkeit einer chronischen Vergiftung dort erwähnt wird. Es ist allerdings zu bemerken, daß beim Methylalkohol weniger die Menge als die Konzentration über seine Toxizität entscheidet, und gerade im Tabakrauch die Konzentration sehr gering ist. Außerdem wird von dieser Spur Methylalkohol (42 mg beim Verrauchen von 70 g Tabak) möglicherweise ein Teil gleich exhaliert. Dabei ist noch zu erwähnen, daß auch von dem resorbierten Teile etwa ein Fünftel der Menge nach *Völtz* und *Dietrich*[3] unverändert ausgeatmet werden kann.

I.

Bei unseren Gewöhnungsversuchen war methodisch auf eine Reihe von Einwendungen Bedacht zu nehmen. Man hat wiederholt (bestärkt durch die bekannten Unterschiede zwischen dem experimentell erzeugten und dem klinisch beim erkrankten Menschen

[1] Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **72**, 444.

[2] Diese Zeitschr. 188, 217, 1927.

[3] Ebendaselbst **40**, 15, 1912.

sich darbietenden Vergiftungsbild) die Vergiftungsursache nicht im CH_3OH selbst, sondern in verschiedenen, häufig anzutreffenden Verunreinigungen desselben suchen zu müssen geglaubt. Diesem gänzlich unbegründeten Einwand konnte von vornherein dadurch begegnet werden, daß neben dem käuflichen, durch die üblichen Prüfungsmethoden als rein befundenen Methylalkohol *synthetisch dargestellter*, sicher tadelloser, absolut einwandfreier gereicht wurde[1]. Es sei vorweggenommen, daß weder hinsichtlich der Formiatbildung noch im klinischen Verlauf der Intoxikation zwischen beiden irgendwelche Unterschiede festzustellen waren.

Objektive Kriterien dafür, daß die mit CH_3OH behandelten Tiere bei den unten folgenden Versuchen nicht nur den Folgen immer wiederholter akuter Intoxikationen unterlagen, sondern einer echten chronischen Vergiftung, analog dem anatomisch und klinisch so gut umrissenen Krankheitsbild des chronischen Alkoholismus der menschlichen Pathologie, waren naturgemäß schwer zu erbringen. Bei einem Hunde (12,5 kg), der in kaum 7 Wochen die enorme Menge von über 1000 ccm 97 %igen CH_3OH erhielt, konnte ich nicht einmal den von früheren Untersuchern für konstant erklärten Befund einer Fettleber erheben. Auch die Untersuchung des Urins auf Eiweiß, Zucker, Gallenfarbstoffe usw. ergab keinerlei Anhaltspunkte[2]. War so ein Krankheitsbild, das einer chronischen CH_3OH-Vergiftung entsprochen hätte, experimentell am Hund nicht zu erzeugen, so gelang es andererseits, eine Gewöhnung an diesen Körper in beträchtlichem Ausmaße zu erzielen (vgl. folgende Protokolle). Die mit langsam ansteigenden Dosen gefütterten Hunde vertrugen nicht nur die anfangs schwer toxischen Quanten ohne Symptome, sondern sogar mehrmals hintereinander Dosen, die für Kontrolltiere sicher tödlich waren und die in der Literatur als letale Dosis angegebenen Werte sogar überstiegen (8 ccm pro Kilogramm Körpergewicht). Bemerkt sei noch, daß bei der Beurteilung der allmählich statthabenden Gewöhnung neben dem Verhalten von Herzaktion, Atmung, Pupillenreaktion, Reflexen vor allem die Temperatur ein sehr feines Kriterium bot.

Die nunmehr mitzuteilenden Protokolle, die sich auf die Frage der Gewöhnung beziehen, bedürfen einer kurzen Erläuterung. Zur Verwendung gelangte teils käuflicher, durch die üblichen Prüfungs-

[1] Der Badischen Anilin- und Sodafabrik, insbesondere Herrn Direktor Dr. *Mittasch*, sei für die Überlassung des synthetischen Alkohols bestens gedankt.

[2] Leberfunktionsprüfungen oder Untersuchungen des Lipoidstoffwechsels, die ja zur Erkennung funktioneller Schädigungen bei chronischer Methylalkoholvergiftung benutzt worden sind, habe ich nicht angestellt. In dieser Richtung wären meine Versuche noch ergänzungsbedürftig.



methoden als rein befundener Methylalkohol, teils das synthetische, von den Badischen Anilin- und Sodawerken uns überlassene Präparat, beide zumeist in 50%iger Verdünnung. Wie bereits oben angedeutet wurde, waren weder im Vergiftungsbilde noch bezüglich der Formiatausscheidung irgendwelche Unterschiede zu konstatieren.

Ein an Alkohol ungewöhnter, 6 kg schwerer Hund schied nach Verabreichung von 10 ccm 97%igen käuflichen Methylalkohols 1,2848 g Na-Formiat in 5 Tagen aus, ein gleich schwerer, ebenfalls ungewöhnter, auf die in Volumprozent entsprechende Dosis des synthetischen Präparats im gleichen Zeitraum 1,3764 g Formiat. Da uns von dem synthetischen CH_3OH nur eine beschränkte Menge zur Verfügung stand, mußten wir davon absehen, einen chronischen Vergiftungsversuch damit anzustellen. Dagegen ließ sich seine dem gewöhnlichen Methylalkohol völlig gleichkommende Giftigkeit genügend deutlich zeigen bei Gelegenheit der Ermittlung der Dosis letalis minima, auf deren nochmalige Feststellung vor Beginn der eigentlichen Gewöhnungsversuche naturgemäß ein gewisser Wert zu legen war.

Ein 10 kg schwerer Hund erhielt 70 ccm gewöhnlichen Methylalkohols (also 7 ccm pro Kilogramm Körpergewicht) mit der gleichen Menge Wasser verdünnt per Schlundsonde in zwei durch 3 Stunden getrennten Dosen. Es folgte ein sehr schweres Vergiftungsbild mit den üblichen Symptomen: nach stundenlanger heftigster motorischer Erregung völliger Verlust der Koordination; klonische Krämpfe, dann immer tiefer werdendes Koma mit schließlich völliger Areflexie, verengten, lichtstarren Pupillen, Anurie, ein Zustand, der im vorliegenden Falle über 48 Stunden anhielt, wobei die Temperatur des durch Decken geschützten Tieres von 38,5° allmählich auf 35,4° absank. Es folgte eine weitere Periode von 2 Tagen, an denen der Hund somnolent, bewegungsunlustig, taumelig erschien, während die Urinsekretion über zunächst sehr geringe Werte (150, 250, 400 ccm, ohne dabei besonders hochgestellt zu sein — ein Beweis, daß es sich um wirkliche Anurie, nicht bloße Retention gehandelt hatte) allmählich in Gang kam, so daß das Tier erst am 6. oder 7. Tage als ein einigermaßen normales imponierte. 14 Tage nach Verabreichung der ersten Dosis, als nach Maßgabe der Formiatausscheidung die Elimination des Alkohols als beendigt angesehen werden durfte, erhielt das Tier unter gleichen Versuchsbedingungen die gleiche Menge *synthetischen* CH_3OH mit dem Erfolge, daß sich dasselbe Vergiftungsbild in allen Zügen und in kaum geringerem Ausmaß abspielte. Durfte aus diesem Ergebnis der Schluß gezogen werden, daß (unter den von uns gewählten Bedingungen) 7 ccm pro Kilogramm Tier an der Grenze zwischen schwer toxischer und minimal letaler Dosis lägen, so wurde diese Vermutung durch die folgenden Versuche bestätigt (Kontrollversuch III und IV). Je ein Tier erhielt 8 ccm pro Kilogramm Körpergewicht gewöhnlichen bzw. synthetischen CH_3OH, und beide Tiere *erlagen* dieser Menge in ziemlich gleicher Zeit (vgl. Protokolle).

Somit konnten 8 ccm pro Kilogramm etwa als minimal letale Dosis betrachtet werden, welches Ergebnis mit den in der Literatur angegebenen Daten gut übereinstimmt.

Damit war ein weiterer Hinweis gewonnen, der bei der Beurteilung einer zu erzeugenden Gewöhnung verwertet werden konnte.

Zwecks Hervorrufung einer Gewöhnung gingen wir nun so vor, daß bei *einem* Tier (Versuch I) die Dosierung unter laufender Bestimmung der Formiatwerte so getroffen wurde, daß erst nach völligem Abklingen der Ameisensäureausscheidung die nächste Gabe gereicht, eine Kumulation mithin vermieden wurde; während bei dem zweiten Tiere gerade ohne Rücksicht auf eine zu erwartende Kumulierung jeden zweiten Tag die nächste, eventuell höhere Menge verabfolgt wurde. Auf beide Weisen gelang es, eine einwandfreie Gewöhnung zu erzielen.

Beim ersten Tiere (Versuch I) kommt es infolge der getroffenen Versuchsanordnungen überhaupt erst bei 5 ccm pro Kilogramm Körpergewicht zu leichten Erscheinungen (eine Menge, die beim ungewöhnten Tiere oft schon schwere Vergiftungserscheinungen hervorruft). Verdopplung dieser Menge auf 10 ccm pro Kilogramm, mithin eine Menge, die nicht unbeträchtlich über der in zwei Versuchen als letal befundenen Dosis liegt, treten zwar die typischen, heftigen Vergiftungserscheinungen ein, Wiederholung des gleichen Versuchs nach Abklingen der Formiatausscheidung mit synthetischem Methylalkohol ergibt jedoch bereits eine merkbar schwächere Reaktion, und trotz zweimaliger Wiederholung mit diesmal eng aneinandergerückten Intervallen wird das jedesmalige Intoxikationsbild auch im Hinblick auf objektive Kriterien wie den Temperaturabfall unverkennbar immer leichter.

Versuch I.

Käuflicher Methylalkohol puriss. Spezifisches Gewicht 0,804 bei 16° = 97 %. Mit destilliertem Wasser: keine Opaleszenz. Mit Jodkalium: keine Entfärbung. Mit Kaliumpermanganat: keine Entfärbung. Hündin, 6 kg, etwa 1¾ Jahre.

Datum	Orale Gabe CH_3OH	Pro kg ccm	Bemerkungen
23. IX.	10 ccm ad H_2O	1,66	Keine Erscheinungen
28. IX.	10 „ „ 40 H_2O	1,66	„ „
3. X.	10 „ „ 30 „	1,66	„ „
7. X.	10 „ „ 20 „	1,66	„ „
12. X.	20 „ „ 40 „	3,32	Ungeschicklichkeit beim Laufen. Häufiges Ausgleiten, Anstoßen mit dem Kopfe, lebhafter Bewegungsdrang, 3 Stunden nach Verabreichung normales Verhalten
23. X.	30 ccm ad 60 H_2O	5,0	Ausgesprochene motorische Unsicherheit bei lebhaftem Bewegungsdrang, etwa 1 Stunde anhaltend. Nach 2 Stunden: das Tier liegt ruhig im Käfig, erscheint etwas träge, reagiert auf jeden Anruf, frißt, später ganz normal
28. X. 12h	Dasselbe	10	Nach der ersten Gabe lebhafteste Exzitation, Bewegungen noch gut koordiniert, von Zeit zu Zeit schreit das Tier, versucht zu beißen
4h	„	10	Nach der zweiten Gabe stärkste motorische Exzitation, wobei das Tier fortwährend hinstürzt und gellend schreit
5h25′			Das Tier liegt im Käfig, Augen geschlossen, Pupillen reagieren. Auf Anruf hebt es den Kopf



Versuch I (Fortsetzung).

Datum	Orale Gabe CH_3OH	Pro kg ccm	Bemerkungen
29. X. 10h früh			Tier liegt in tiefstem Koma. Anurie seit 24 Stunden. Temperatur 36,6° (38,5° vor Verabreichung)
6h			Gegen Abend erhebt sich das Tier taumelnd, frißt, läßt Urin (kein Eiweiß, kein Zucker, kein Aceton, keine Gallenfarbstoffe)
30. X. 10h früh			Das Tier erscheint bis auf eine gewisse Mattigkeit normal. Temperatur 38°
11. XI. 10h 30′	30 ccm synthet. CH_3OH ad 60 H_2O	10	Nach der ersten Gabe keinerlei deutliche Symptome
3h	Dasselbe		Nach der zweiten Gabe gleiches Vergiftungsbild wie oben, jedoch deutlich schwächer ausgeprägt und rascher abklingend
6h			Der Hund frißt etwas, erhebt sich spontan, bewegt sich relativ geschickt. Temperatur 37,5°
12. XI. 9h früh			Der Hund hat Urin gelassen (ohne Befund), liegt ruhig im Käfig, nimmt Futter, reagiert auf jeden Anruf. Pupillen, Reflexe ohne Befund
12h			Der Hund taumelt noch etwas beim Herumlaufen. Temperatur 37,8°
4h nachm.			Anscheinend völlig normales Verhalten
18. XI. 9h früh	30 ccm gewöhnl. CH_3OH ad 60 H_2O	10	Keine nachweisbaren Symptome
2h	Dasselbe		Starke motorische Unruhe, die jedoch nicht vom Koma gefolgt ist; nach 3 Stunden liegt der Hund etwas träge im Käfig, schläft nicht, reagiert auf Anruf, nimmt dargereichtes Futter ungeschickt. Temperatur 37,8°. Urin ohne Befund. Am nächsten Morgen außer einer gewissen Trägheit symptomlos
21. XI. 9h 30′	30 ccm synthet. + 30 Wasser	10	Erste Dosis: starke Salivation, Bewegungsdrang ohne Koordinationsstörungen. Zweite Dosis: mäßige motorische Exzitation, Anstoßen im Käfig, aber kein Hinstürzen. Schreit viel (Kolikschmerzen?). 4 Uhr: der Hund liegt mit geöffneten Augen im Käfig, reagiert auf jeden Anruf. Beim Laufen und Fressen ziemlich ungeschickt. Temperatur 37,6°
22. XI.			Morgens: etwas träge und ungeschickt. Beim Versuch, in den Käfig zu springen, springt er fehl. Nachmittags: anscheinend völlig erholt

Beim zweiten, dem folgenden Versuch treten die ersten deutlichen Erscheinungen gemäß der statthabenden Kumulation schon bei 2,4 ccm pro Körperkilogramm ein, 4 ccm pro Körperkilogramm erzeugen bereits ziemlich stürmische Erscheinungen. Jedoch trotz Weiterverabreichung der gleichen Mengen in zweitägigen Intervallen schwinden schließlich alle Symptome bis auf gelegentliche leichte motorische Unsicherheit. Nach Verbrauch von 630 ccm 97 %igen Methylalkohols machen 4 ccm pro Kilogramm überhaupt keine Erscheinungen (Versuch II, 3. XII.); es muß zwecks Bestimmung der Ameisensäureausscheidung des ge-

wöhnten Tieres auf eine Methylalkoholdosis und auf subkutan verabreichtes Formiat eine 20tägige Pause eingeschaltet werden. Nach Ablauf derselben ist das Tier, wie die Protokolle zeigen, seiner Gewöhnung nicht verlustig gegangen, ja, es gelingt, ihm dreimal hintereinander 8 ccm pro Körperkilogramm, ohne daß eine schwerere Vergiftung mit Koma usw. eintritt, beizubringen. Nach insgesamt 1015 ccm CH_3OH! innerhalb von zwei Monaten ist das Tier noch am Leben gewesen, dann allerdings stirbt der Hund, aber nicht infolge einer chronischen Vergiftung, sondern infolge eines durch die hohen Alkoholkonzentrationen gesetzten sekundären Schadens: einer abundanten Magenblutung.

Der Versuch lehrt, daß trotz der notwendig eintretenden Kumulation eine ziemlich weitgehende Gewöhnung möglich ist (s. Versuch II).

Versuch II.

Männlicher Hund, 12,5 kg; infolge Ischiaticusdurchschneidung an der linken Hinterpfote etwa zehnpfennigstückgroßes trophisches *Ulcus*.

Datum	Orale Gabe CH_3OH	Pro kg ccm	Bemerkungen
21. X.	20 ccm ad 40 H_2O	1,6	Keinerlei Symptome
23. X.	Dasselbe	1,6	„ „
25. X.	„	1,6	„ „
27. X.	30 ccm ad 60 H_2O	2,4	„ „
29. X.	Dasselbe	2,4	Leichte motorische Unsicherheit beim Laufen. Nach 4 Stunden normal
31. X.	30 ccm ad 60 H_2O	2,4	Etwas ausgesprochenere Koordinationsstörungen, keine Schläfrigkeit, nach 5 Stunden ist nichts mehr nachweisbar. Kein Temperaturabfall. Urin ohne Befund
2. XI. 11h	25 ccm ad 50 H_2O	4,0	Keine Symptome
4h 30′	Dasselbe	4,0	Nach der zweiten Gabe starkes Taumeln, Bewegungstrieb, sehr häufiges Anstoßen und Hinstürzen. 6 Uhr: das Tier frißt äußerst ungeschickt. Temperatur 37,5°, nur durch laute Anrufe aus seiner Somnolenz erweckbar
4. XI. 11h	50 ccm ad 100 H_2O auf einmal	4,0	15 Minuten nach Verabreichung schwerer Rausch. 5 Uhr: schläfrig, aber prompt auf jeden Anruf reagierend, Pupillen und Reflexe normal, frißt
6. XI.	Dasselbe	4,0	Bald nach Verabreichung große Apathie, die bald in Koma übergeht, keinerlei Reaktion auslösbar. Pupillen verengt, schwache Lichtreaktion. Atmung verlangsamt, Temperatur ↓37° (38,6° normal)
7. XI.			Das Tier ist noch schwer benommen, erholt sich erst langsam im Laufe des Tages. Nach 30stündiger Anurie Harn ohne pathologische Bestandteile, bis auf Aceton (Jodoform ++, Legal +)
8. XI. 9h	25 ccm ad 50 H_2O	4,0	Keinerlei Symptome
3h 30′	Dasselbe		Tier etwas träge, frißt, bewegt sich spontan, Urin, Temperatur normal. Gewicht 12,8 kg

Versuch II (Fortsetzung).

Datum	Orale Gabe CH_3OH	Pro kg ccm	Bemerkungen
10. XI.	50 ccm ad 100 H_2O	4,0	Angedeutete motorische Unsicherheit, später anscheinend etwas müde. Pupillen, Reflexe ohne Befund. Auf Anruf reagierend, frißt. Temperatur 38,2°
12. XI.	Dasselbe	4,0	Wie oben
14. XI.	„	4,0	Unbedeutender Verlust durch Herauswürgen, keine Symptome
17. XI.	„	4,0	Etwas träge? Sonst keine Symptome
19. XI.	„	4,0	Keine Symptome. Temperatur 38,1°. Urin ohne Befund
21. XI.	„	4,0	Wie oben
3. XII.			Die Ameisensäureausscheidung im Urin ist zur Norm abgefallen
4. XII.	10 ccm ad 20 H_2O	0,8	Bestimmung der Formiatausscheidung (s. unten)
11. XII.	75 ccm ad 150 H_2O		
9h	in zwei Dosen	6,0	Nach der ersten Gabe Ungeschicklichkeit beim Laufen
3h			Liegt ruhig im Käfig, schwer zum Aufstehen zu bewegen. Reagiert auf Anruf, frißt. Temperatur 38,1°
13. XII.			
12h	50 ccm ad 100 H_2O	8,0	Nach der ersten Gabe benommen, reagiert auf Anruf, ist schwer zu Bewegungen zu veranlassen. 6 Uhr: Der Hund frißt sehr ungeschickt taumelt, schläft bald ein
4h	Dasselbe		
18. XII.			
10h	100 ccm ad 200 H_2O	8,0	12 Uhr: Hund anscheinend benommen, liegt ruhig im Käfig, reagiert auf Anruf; nachmittags geringe Ungeschicklichkeit beim Laufen. Temperatur 38,2°
20. XII.			
10h	50 ccm ad 100 H_2O		Keine Erscheinungen
4h	Dasselbe	8,0	Ungeschicktes Fressen, nachher Schlaf. Urin: kein Eiweiß, kein Zucker, keine Gallenfarbstoffe
21. XII.			
9h			Der Hund erscheint normal, frißt

22. Dezember. Das Tier, das massenhaft teils geronnenes, teils flüssiges Blut erbrochen hat, ist tot.

Sektion: Die rechte Lunge ist im Bereich des Oberlappens infiltriert, die linke ist normal.

Magen und Dünndarm enthalten eine große Menge teils geronnenen, teils flüssigen Blutes. Die Schleimhaut des Magens zeigt neben stärkster entzündlicher Schwellung und blutiger Imbibition mehrere Ulcerationen. Der Herd der Blutung ist nicht mit Sicherheit erkennbar. Auch die Schleimhaut des Dünndarms ist in beträchtlicher Länge stärkstens entzündlich geschwollen und mit einzelnen punkt- bis pfenniggroßen Blutaustritten versehen; an diesen Stellen ist die Schleimhaut abgehoben.

Parenchymatöse Organe: Leber, Niere, Milz, Herz makroskopisch unverändert.

Kontrollversuch III.

Männlicher Hund, 12 kg. Urin frei von krankhaften Bestandteilen, Temperatur 38.4°.

Datum	Orale Gabe CH_3OH	Pro kg ccm	Bemerkungen
30. XII.	96 ccm + Wasser aa in 2 Dosen	8,0	Bereits eine Stunde nach Verabreichung der ersten Hälfte tiefe Somnolenz; der Hund reagiert kaum noch auf Anruf. Temperatur 38,1°. Nach der zweiten Hälfte: Das Tier schläft tief. Temperatur 37,5°. Pupillen fast lichtstarr. Erhält Decken
31. XII.			Tiefes Koma. Anurie. Temperatur 36,6°
2. I.			Tiefstes Koma, komplette Anurie seit dem 30. XII. Temperatur 34,9°. Gegen Mittag Krämpfe der linken Körperhälfte
3. I.			Morgens Tod an Atemlähmung

Sektion: Außer geringer entzündlicher Injektion der Magenschleimhaut und der pylorischen Region kein Befund.

Kontrollversuch IV.

Männlicher Hund, 12,5 kg. Urin ohne Befund.

Datum	Gabe CH_3OH	Pro kg ccm	Bemerkungen
23. I. 12h	50 ccm CH_3OH synthet.		Nach der ersten Gabe sehr starker Speichelfluß, Taumel. Exzitation, heftiges Schreien. Nach der zweiten Gabe stürzt der Hund sehr bald zusammen. Um 6 Uhr tiefer Schlaf
3h	Dasselbe	8,0	Tiefes Koma. Temperatur des zugedeckten Tieres 35,4°. Anurie
24. I.			
25. I.			Tier tot

Sektion: Geringe Hyperämie von Magen und Duodenum, sonst kein Befund.

II.

Frage des Mechanismus der Gewöhnung an Methylalkohol.

Nachdem die oben beschriebenen Versuche eine Resistenzsteigerung gegen CH_3OH bei chronischer Zufuhr gezeigt hatten, war die Art dieser Gewöhnung, ob einfache celluläre Anpassung oder Änderung der Alkoholverbrennung bzw. -ausscheidung nur durch — den gesamten Stoffwechsel des CH_3OH gleichzeitig erfassende — Versuche zu erklären (also quantitative Bestimmung des Methylalkohols und seiner Derivate in Kot, Harn, exhalierter Luft und im Blute). Da dieser Weg — aus äußeren Gründen — nicht gangbar erschien, so wählten wir zwecks wenigstens teilweiser Klärung des Problems einen anderen: Bestimmung des typischen intermediären Umwandlungsprodukts des CH_3OH, der Ameisensäure, im Urin *allein*.

Reicht man einem Hunde, dessen normale Ausscheidungsmenge an Formiat bekannt ist, eine mäßige Menge Methylalkohol und bestimmt



laufend die Ameisensäureausscheidung, so erhält man die von *Pohl* beschriebene typische protrahierte Ausscheidungskurve, mit ihrem Gipfel am 2., meist am 3. oder 4. Tage. Am 5. Tage war die Ausscheidung gewöhnlich zur Norm abgesunken. Führte man jetzt dem Tiere wieder die gleiche Menge Methylalkohol zu, unter laufender Bestimmung der Formiatausscheidung, so fand sich nach relativ seltener Wiederholung der gleichen Dosis als erste, gesetzmäßige Folge: ein Absinken der Ameisensäureausscheidung auf etwa die Hälfte der in den gleichen vorangehenden Zeitabschnitten ausgeschiedenen Werte.

Versuch V.

Hündin, 6 kg.

22. September. Urinmenge: 310 ccm, enthält 0,015 g Na-Formiat.

	Datum	Na-Formiat g	Harnmenge ccm	CH_3OH
I.	23.—24. IX.	0,1008	410	10 ccm ad 100 ccm Wasser
	24.—25. IX.	0,7021	600	
	25.—26. IX.	0,3782	520	
	26.—27. IX.	0,0755	460	
	27.—28. IX.	0,0282	500	
		1,2848		
II.	28.—29. IX.	0,0832	740	10 ccm ad 40 ccm Wasser
	29.—30. IX.	0,8735	510	
	30. IX.—1. X.	0,1794	600	
	1.—2. X.	0,0760	660	
	2.—3. X.	0,0362	520	
		1,2483		
III.	3.—4. X.	0,1550	420	10 ccm ad 30 ccm Wasser
	4.—5. X.	0,2236	540	
	5.—6. X.	0,0504	620	
	6.—7. X.	0,0428	420	
		0,4718		

Während also in den beiden ersten Ausscheidungsperioden von 5 Tagen die gefundenen Gesamtwerte fast genau übereinstimmen, sinkt in der dritten viertägigen Periode die Ausscheidung plötzlich auf unter die Hälfte des zu erwartenden Wertes. In der nächsten Periode bleibt der Wert — bei gleichbleibender Dosis — ungefähr gleich niedrig. Verdoppelt man nun die zugeführte CH_3OH-Menge, so erhält dessenungeachtet die Ausscheidungsverminderung in gleicher Weise an, wie der Fortgang des Versuchs in den nächsten drei Perioden zeigt, trotzdem wie in II die *Ausscheidungsdauer* zunimmt.

Erst wenn man exzessiv hohe Dosen reicht (10 ccm pro Kilogramm, also für ungewöhnte Tiere die im allgemeinen als tödlich anzusprechende Menge), so kann dieser gesetzmäßige Vorgang der Ausscheidungs-

Versuch VI.
(Fortsetzung von Versuch V.)

	Datum	Na-Formiat g	Harnmenge ccm	CH_3OH
I.	7.— 8. X.	0,0754	230	10 ccm ad 20 ccm Wasser am 7. X.
	8.— 9. X.	0,3221	700	
	9.—10. X.	0,0871	570	
	10.—11. X.	0,0564	500	
	11.—12. X.	0,0134	520	
		0,5549		
II.	12.—13. X.	0,0448	380	20 ccm Methylalkohol ad 40 ccm Wasser am 12. X.
	13.—14. X.	0,6169	450	
	14.—15. X.	0,4092	520	
	15.—16. X.	0,0785	600	
	16.—17. X.	0,0578	500	
	17.—18. X.	0,0501	400	
	19.—20. X.	0,0109	600	
		1,3020		
III.	23.—24. X.	0,1696	480	30 ccm Methylalkohol + 30 ccm Wasser am 23. X.
	24.—25. X.	0,3684	520	
	25.—26. X.	0,7432	600	
	26.—27. X.	0,2560	570	
	27.—28. X.	0,0285	410	
		1,5657		

verminderung durchbrochen werden und ein dem ursprünglichen Ausscheidungsmodus ähnlicher Wert auftreten. (Möglichenfalls deshalb, weil bei dem komatös daliegenden und an Harnverhaltung leidenden Tiere unverändert in die Blase gelangter Methylalkohol rückresorbiert wird und einer sekundären Spaltung unterliegt; vgl. *Völtz* und *Dietrich*[1].)

Versuch VII.
Dasselbe Tier wie Versuch VI.

Datum	Na-Formiat g	Harnmenge ccm	CH_3OH
28.—29. X.	0,0976	270	60 ccm Methylalkohol + 60 ccm Wasser am 28. X.
29.—30. X.	1,0445	210	
30.—31. X.	2,7584	1400	
31. X.—1. XI.	1,1727	600	
1.—2. XI.	1,3095	400	
2.—3. XI.	0,8997	660	
3.—4. XI.	—	520	
4.—5. XI.	0,2831	350	
5.—6. XI.	0,1232	450	
6.—7. XI.	0,0354	450	
7.—8. XI.	0,0155		
	7,6396		

[1] l. c.

Um einen Hinweis zu gewinnen, worauf die Tatsache der verminderten Formiatausscheidung beruhe (deren Vieldeutigkeit noch unten weiter zu diskutieren sein wird), reichten wir dem gleichen Tiere, nachdem die Ausscheidungsverminderung eingetreten war, reines Natriumformiat subkutan (2 g in 10 %iger wässeriger Lösung).

Versuch VIII.

Dasselbe Tier wie im Versuch VII. 2 g Na-Formiat subkutan.

1. Tag	0,5032
2. „	0,0239
3. „	0,0152
	0,5423

Ein ungewöhntes Tier von gleichem Gewicht lieferte unter gleichen Umständen 0,6016 g, verbrannte also die zugeführte Ameisensäure nur wenig schlechter (vgl. folgenden Versuch).

Versuch IX.

Männlicher Hund, 5500 g, 1 ½ Jahre, ungewöhnt. 2 g Na-Formiat subkutan.

1. Tag	0,5663 g
2. „	0,0201 g
3. „	0,0172 g
	0,6016 g = 30 %

Das gewöhnte Tier verbrannte also von parenteral zugeführtem Formiat 73 %, das ungewöhnte Tier 70 %; womit gezeigt ist, daß das gefundene Sinken der Formiatmengen im Urin *nicht* wesentlich auf eine intermediäre Oxydationssteigerung bezogen werden kann.

(Die Divergenz der gefundenen Ausscheidungsquoten in *Pohl* und *Assers* Versuchen einerseits, die sich zwischen 18 und 20 % bewegen, und in den meinigen, wo sie eine Maximalhöhe von etwa 30 % in einzelnen Versuchen erreichen, mag auf die Verschiedenheit der gewählten Applikationsart — orale Verabfolgung bei *Pohl* und *Asser*, parenterale bei mir — bezogen werden.)

Da jedoch bei den bisher angeführten Versuchen der Einwand möglich erscheint, daß bei so verhältnismäßig seltener Verabfolgung der Dosen eine *Gewöhnung* zweifelhaft sei, so wurde der analoge Versuchsmodus wiederholt bei dem Hunde, der bereits (vgl. Versuch 3 des ersten Abschnitts) 650 ccm Methylalkohol (97 %igen) in 30 Tagen erhalten hatte und — wie die oben angeführten Protokolle lehren dürften — auf Grund der Beobachtungen als ein mit Sicherheit weitgehend gewöhnter Hund bezeichnet werden muß.

Das Ergebnis war prinzipiell das gleiche:

Männlicher Hund, 12,5 kg (vgl. Protokoll III), erhielt in 30 Tagen 650 ccm reinen Methylalkohol in steigenden Dosen. Er vertrug zuletzt 50 ccm Methylalkohol, jeden 2. Tag gereicht, ohne Symptome (gleich 4 ccm pro Kilogramm), während anfangs 2,4 ccm pro Kilogramm schwere Symptome gesetzt hatten, und er auf die ersten Dosen zu 50 ccm mit typischem, schwerem Koma reagiert hatte. Die Formiatausscheidung ist nach 13 Tagen zur Norm abgefallen (am 3. Dezember). Formiatmenge dieses Tages: 0,0120. Er erhält nun am folgenden Tage 10 ccm CH_3OH mit der gleichen Menge Wasser verdünnt per Schlundsonde zwecks Prüfung der Formiatausscheidung.

Versuch X.

Datum	Na-Formiat g	Harnmenge ccm	CH_3OH
4. XII.	0,0632	560	100 ccm CH_3OH + 10 ccm Wasser
5. XII.	0,3120	1000	
6. XII.	0,2036	850	
7. XII.	0,0440	450	
8. XII.	0,0100	500	
	0,6328		

Dagegen lieferte ein Kontrolltier von gleichem Gewicht, das nie Methylalkohol erhalten hatte, 1,5250 g Na-Formiat im gleichen Zeitraum unter gleichen Versuchsbedingungen. Vgl. die Tabelle des Versuchs XI.

Versuch XI.

Kontrollversuch.

Männlicher, ungewöhnter Hund von 12 kg Gewicht. Normalausscheidung am Vortage des Versuchs 0,0086 g Na-Formiat. Am 5. Dezember 10 ccm CH_3OH + 10 ccm Wasser per Schlundsonde.

Datum	Na-Formiat g	Harnmenge ccm	CH_3OH
5. XII.	0,0964	400	100 ccm CH_3OH + 10 ccm Wasser am 5. XII. früh
6. XII.	0,5866	560	
7. XII.	0,7428	980	
8. XII.	0,0842	520	
9. XII.	0,0150	410	
	1,5250		

Das Verhalten des gewöhnten und des ungewöhnten Tieres auf parenterale *Na-Formiatbelastung* ist ebenfalls dem an erster Stelle mitgeteilten Versuch entsprechend. Das erwähnte, an hohe Methylalkoholdosen gewöhnte Tier erhielt 2 g Formiat subkutan und schied in 3 Tagen 0,4282 g Formiat = 21,4% aus, während ein gleiches, ungewöhntes Kontrolltier 27,7% = 0,5548 g Formiat lieferte. Vgl. die Tabellen XII und XIII.



Der erwähnte, weitgehend gewöhnte Hund (650 ccm Methylalkohol in 30 Tagen) erhielt unmittelbar nach der bereits mitgeteilten Belastung mit 10 ccm Methylalkohol und folgender Formiatbestimmung 2 g reines, getrocknetes Na-Formiat in wässeriger Lösung subkutan. Ameisensäureausscheidung am Vortage 0,0100, am 8. Dezember.

Versuch XII.

Datum	Na-Formiat g	Harnmenge ccm	CH_3OH
9. XII.	0,3210	1100	2 g Formiat subkutan am 8. XII.
10. XII.	0,0852	650	
11. XII.	0,0220	480	
	0,4282 = 21,4 %		

Versuch XIII.

Kontrolltier.

Männlicher Hund, 12 kg, ungewöhnt. Normalausscheidung am Vortage 0,0065 g Formiat. 2 g getrocknetes, reines Na-Formiat in 20 %iger wässeriger Lösung subkutan.

1. Tag	0,4012 g	950 ccm	
2. „	0,1426 g	700 „	2 g Na-Formiat subkutan
3. „	0,0110 g	380 „	
	0,5548 g = 27,7 %		

In diesem Versuch also verbrennt das gewöhnte Tier zugeführtes Formiat wenigstens um etwa 6% besser als ein normales.

Zusammenfassend ließe sich also aus dem vorstehend Mitgeteilten folgern:

I. Nach chronischer Aufnahme von Methylalkohol und anscheinend parallel mit einer stattgehabten Gewöhnung kommt es zu einer Verminderung der Formiatausscheidung im Harn.

II. Diese Verminderung beruht nicht — oder nur in allerbescheidenstem Umfange — auf einer Mehrverbrennung intermediär gebildeten Formiats.

Es erscheint lohnend, diese Ergebnisse zu vergleichen mit Befunden *Assers* (l. c.), die in mancher Hinsicht eine erwünschte Ergänzung bieten. *Asser* fand nämlich in Verfolgung seines Problems über die Änderung der Methylalkoholoxydation durch andere Alkohole:

1. Bei mit Äthyl-Amylalkohol kombiniert vorbehandelten Tieren sanken die Formiatwerte im Urin bei nachträglicher CH_3OH-Verabreichung.

2. Dieses Sinken der Formiatwerte beruht auf einer leichten Steigerung der Fähigkeit zur Formiatoxydation (bei exogener Zuführung desselben) unter dem Einfluß der genannten Alkohole.

Diese letztgenannten Punkte suchte *Asser* auf indirektem Wege zu beweisen: Er fütterte Tiere gleichzeitig mit verschiedenen Alkoholen (Methylalkohol ausgenommen) + Na-Formiat und fand, daß auch bei dieser Versuchsanordnung die Formiatwerte auf unter die Hälfte der Norm absanken, *ohne daß die Exhalationsquote zunahm*. Dieses Resultat Formiat + Äthylalkohol auf die Kombination Methylalkohol + Äthylalkohol übertragend, schließt *Asser*: „Würde die Äthylalkoholkombination gewiß nicht dadurch zum Anlaß für eine Minderausscheidung von Formiat werden, daß die Exhalation in die Höhe geht, sondern eher in einer Förderung der Formiatoxydation."

In Ansehung unseres Problems folgt aus der Vergleichung der mitgeteilten Befunde:

Sowohl bei mit Äthylalkohol wie bei mit Methylalkohol chronisch vergifteten Tieren erleidet die Formiatoxydation eine gleichsinnige Störung: Sinken der Ameisensäurewerte im Urin auf Methylalkoholdarreichung.

Jedoch beruht beim äthylalkoholgewöhnten Tiere die genannte Verminderung — sofern man die *Asser*sche Beweisführung als zwingend unterstellt — auf einer Förderung der Formiatoxydation, vermutlich also auf vollständigerer Verbrennung des CH_3CH, nicht auf vermehrter Exhalation.

Beim methylalkoholgewöhnten Tiere beruht dieser Vorgang *nicht* oder nur im allerbescheidensten Umfange auf einer vermehrten Verbrennung. Es muß offengelassen werden, ob beim methylalkoholgewöhnten Tiere eine vermehrte Exhalation oder — und damit wäre den drei von *Asser* erwogenen Möglichkeiten: vermehrte Formiatoxydation, verminderte Formiatoxydation, vermehrte Exhalation, ein vierter Punkt hinzugefügt — ob eine Ausscheidung unzersetzten CH_3OH etwa durch Niere und Darm in beträchtlichem Umfange für das Sinken der Formiatwerte verantwortlich zu machen sei. Die Möglichkeit einer vermehrten Exhalation wäre schon deshalb in Betracht zu ziehen, weil bekanntlich schon in der Norm der Anteil der Exhalation an der Ausscheidung des Methylalkohols ein sehr beträchtlicher ist; fanden doch *Völz* und *Dietrich* in ihren Versuchen den Mittelwert von 21,5% der verabreichten Dosis CH_3OH im Exhalat der ersten 48 Stunden wieder, und *Asser* erhielt in einem siebentägigen Versuch im ganzen 55,8% der verabfolgten Dosis in der ausgeatmeten Luft seines Tieres, und zwar am ersten Tage 13,9 %, am zweiten 13 %, am vierten noch 10 %. Allerdings könnte eine *vermehrte* Exhalation

ja nur statthaben, wenn entweder der Alkoholspiegel im Blute über die Norm anstiege oder die Atemgröße eine Zunahme erführe.

Auf der anderen Seite beweisen die Versuche von *Völz* und *Dietrich*, daß unter bestimmten Versuchsbedingungen sehr beträchtliche Mengen unveränderten Methylalkohols in den Urin übergehen können (bis zu 15%), und die genannten Autoren glauben, die von ihnen öfters gefundenen niedrigeren Werte auf besondere Faktoren, wie Rückresorption aus der Blase, zurückführen zu müssen. Auch *Bougers*[1] konnte ein erhebliches Übergehen von CH_3OH in den Urin feststellen.

Zusammenfassend kann mithin gesagt werden:

1. Beim Hunde gelingt es, in kurzer Zeit eine experimentelle Gewöhnung an sicher tödliche Dosen von Methylalkohol zu erzeugen. Ein Versuchstier vertrug die gewaltige Menge von über 1 Liter CH_3OH, verteilt auf 2 Monate. Das chronische Vergiftungsbild verläuft ohne besonders charakteristische Züge.

2. Parallel mit dieser Gewöhnung sinkt die Formiatausscheidung im Urin.

3. Die Verminderung der Formiatausscheidung beruht nicht auf einer Mehrverbrennung vorgebildeten Formiats.

Überträgt man die an Hunden gewonnenen Erfahrungen auf den Menschen, so ist selbst bei Voraussetzung einer besonderen Empfindlichkeit seines Nervensystems eine Gewöhnungsmöglichkeit für Methylalkohol im allgemeinen anzunehmen. Behauptungen aber, die die Schädlichkeit des Tabakrauchens auf die Gegenwart von Zentigrammen Methylalkohol im Rauche zurückführen wollen, sind sicher übertrieben. In dieser Richtung ist es vielleicht wertvoll, daß Versuche von *Rewiger*[2] vorliegen, wonach selbst Gaben von 5 ccm CH_3OH nur eine leichte, vielleicht fragliche Störung des N-Stoffwechsels bedingen (Steigerung des Gesamt-N von 0,53 auf 0,7 g in 24 Stunden am Kaninchen).

---

[1] Arch. f. exper. Pathol. 35, 415.
[2] Zeitschr. f. ges. exp. Med. 23, 368, 1922.

Über die Anwendung der Stolteschen Veraschungsmethode in der Mikroanalyse.

Von

Carla Egg und K. Klinke.

(Aus der Physiologisch-chemischen Anstalt der Universität Basel.)

(Eingegangen am 5. November 1927.)

Die Bestimmung der basischen Mineralbestandteile in der Asche tierischer Gewebe oder Flüssigkeiten bereitet wegen der leichten Flüchtigkeit der beiden Alkalichloride (Schmelzpunkt von KCl = 772° C, von NaCl = 820° C; Schmelzpunkt des Eutektikums mit 56% KCl und 44% NaCl = 640° C) (*Plato* und *Ruff*) Schwierigkeiten. Für die Makroanalyse ist nun von *K. Stolte* eine Methode der Veraschung im Luftbade angegeben worden, die, wie mannigfache Nachprüfungen ergaben, keine Verluste an den beiden Alkalien eintreten läßt.

Die zu veraschende Substanz wird in einen Platintiegel eingewogen, und dieser in einem größeren Porzellantiegel auf einige Tonklötzchen gestellt, so daß er rings von einem Luftmantel umgeben ist. Zunächst wird mit fächelnder Flamme abgebrannt und schließlich mit aufgelegtem Deckel in der vollen Flamme eines Teklubrenners zu Ende verascht. Um die Behinderung der Veraschung durch Inkrustation der Kohlepartikelchen mit Salzen zu vermeiden, läßt *Stolte* ein- bis zweimal einige Tropfen Wasser zu der teilweise veraschten abgekühlten Substanz zusetzen, im Trockenofen bei schräg gestellter Schale abdampfen und erneut bis zum völligen Weißwerden der Asche glühen.

So einfach und leicht zu handhaben diese Methode ist, so hat sie in der Mikroanalyse verhältnismäßig wenig Beachtung gefunden. Zwar ist von *Kramer* und *Tisdall* dieser Weg für die Aschenanalyse des Blutes angegeben worden; eine Bestimmung, ob bei den Mikromengen der Dampfdruck der beiden Alkalichloride nicht doch höher würde, als der Genauigkeit der Analyse zuträglich ist, wurde von ihnen nicht ausgeführt.

Immer wiederkehrende neue Vorschläge weisen darauf hin, daß nach einer zuverlässigen Methode gesucht wird, die ohne viel Zuwarten

(Zeit dazu steht ja wohl selten zur Verfügung), eine innerhalb der sonstigen Fehlergrenzen liegende Genauigkeit garantiert.

Wir haben aus diesem Grunde die *Stolte*sche Veraschungsmethode einer systematischen Untersuchung an Mikromengen unterworfen. indem Wägungen vor und nach der Veraschung ausgeführt wurden. Zur Ausführung der Wägungen stand uns eine Bunge-Mikroschnellwage zur Verfügung, die mit einer Genauigkeit von etwa 2 bis 3 γ arbeitet.

Wir lassen nachstehend unsere Resultate folgen. die zeigen, daß diese Veraschungsmethode auch bei Anwesenheit von nur $^1/_{10}$ mg Alkalichlorid in dem Veraschungsgut absolut Hinreichendes leistet.

Auszug aus den Protokollen.

	Platinschiffchen I g	Platinschiffchen II g
Gewicht leer	0,443 239	0,463 279
Nach 2 Std. Glühen nach *Stolte*	0,443 241	0,463 280
Abgeknistertes KCl eingewogen	0,476 379	0,480 615
Nach 6 Std. Glühen	0,476 379	0,480 618
Neue Einwaage von KCl	0,454 218	0,476 421
Dazu abgeknistertes NaCl eingewogen	0,465 238	0,490 542

(Also in I: 10,977 mg KCl und 11,020 mg NaCl = etwa 50 und 50 %; in II: 13,141 mg KCl und 14,121 mg NaCl = etwa 48 und 52 %. Die Zusammensetzung der Einwage liegt somit in der Nähe des oben erwähnten Eutektikums mit dem Schmelzpunkt von 640°.)

	Platinschiffchen I g	Platinschiffchen II g
Nach 4 Std. Glühen	0,465 239	0,490 539
Dazu Traubenzucker mit dem Aschegehalt von 0,05 % eingewogen	0,479 160	0,510 170
Addiert man zu den Gewichten der mit KCl und NaCl beschickten Tiegel das Aschegewicht der eingewogenen Traubenzuckermengen, so erhält man	(0,465 246)	(0,490 549)
Nach *Stolte* verascht (4 Std. geglüht)	0,465 260	0,490 559

Wie aus den Zahlen hervorgeht, ist die Zuverlässigkeit dieser Veraschungsmethode eine sehr große. Auf eine Fehlerquelle, die sich aber nur bei der Bestimmung des Aschenrückstandes bemerkbar macht. soll die Aufmerksamkeit gelenkt werden. Bei einer unserer Analysenreihen traten unerklärliche Zunahmen im Gewicht — bis 20 γ — auf. Es stellte sich heraus, daß die Porzellanschale durch das lange Glühen einen Sprung bekommen hatte; Flammengase konnten infolgedessen

durchtreten und bildeten wahrscheinlich Platin-Kohlenstofflegierungen, die die beobachtete Gewichtszunahme bedingten. Beim Glühen im elektrischen Ofen, wobei wir durch untergeschobene Tonklötzchen von 2 mm Höhe den Luftmantel herstellten, sowie in einer heilen Porzellanschale mit gut ziehendem Brenner traten diese Zunahmen nicht auf.

Zur weiteren Analyse ist es nach dem Vorgang von *Kramer* und *Tisdall* nur nötig, die Asche in n/10 Salzsäure aufzunehmen und die einzelnen Bestimmungen anzuschließen. Die Überführung aus dem Tiegel kann bei einigermaßen geschicktem Arbeiten ohne Verluste vor sich gehen, wie folgender Versuch zeigt:

Eingewogen. . . . . . 0,025000 g KCl 0,030320 g KCl

Nach 6 Stunden Glühen im elektrischen Ofen Tiegelgewicht völlig ungeändert. In einen 100,0-ccm-Meßkolben überführt und in je 2,5 ccm Kalium als Kobaltinitrit bestimmt (Titration des Nitrits mit Kaliumpermanganat)

I	13,20 mg-%	K =	25,12 mg-%	KCl
II	15,95 „	K =	30,41 „	KCl

Die Methode läßt sich also überall in der Mikroanalyse anwenden, wo es sich darum handelt, die basischen Bestandteile zu ermitteln. Die Bestimmung von P, Cl und S bleibt immer der feuchten Veraschung vorbehalten, am besten wohl in der Modifikation, daß mit rauchender Salpetersäure unter Zusatz von Silbernitrat verascht wird (vgl. *Tschopp*).

Als technische Bemerkung möchten wir noch anschließen, daß auf gründlichste Trocknung sowohl des Analysenmaterials wie der halbveraschten Substanz nach dem Wasserzusatz geachtet werden muß. Hier können sich sonst leicht Fehler, die durch das Abknistern der Alkalichloride entstehen, einschleichen. Durch Aufsetzen des Deckels ist diesem Übelstand eine weitere Schranke gesetzt.

Literatur.

Plato und *Ruff*, Ber. d. chem. Ges. **36**, 2357, 1903; Zeitschr. f. physik. Chem. **58**, 350, 1907. — *Stolte*, diese Zeitschr. **35**, 104, 1911. — *Kramer* und *Tisdall*, Journ. biol. chem. **48**, 1, 1921. — *Tschopp*, Zeitschr. f. Mikrochem. **5**, 161, 1927.

Kann Milchsäure anaerob aus der Muskulatur verschwinden?

Von

F. Lipmann.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 7. November 1927.)

Während nach *O. Meyerhof* einmal im Muskel gebildete Milchsäure nur durch Oxydation zum Verschwinden gebracht werden kann, wobei die Milchsäure, soweit sie nicht selbst verbrennt, zu Glykogen resynthetisiert wird, soll nach *Embden* und seinen Mitarbeitern Milchsäure auch anaerob zum Verschwinden kommen, und zwar beobachteten sie dies bei zahlreichen Gelegenheiten in Gegenwart höherer Fluoridkonzentrationen[1]. In einer zusammenfassenden Betrachtung darüber stellt *Embden* fest[2], daß „auch bei denkbar vollständiger Abwesenheit von Sauerstoff, d. h. in einer Atmosphäre von reinem Stickstoff oder Wasserstoff, Muskelbrei unter der Einwirkung von Natriumfluorid in höheren Konzentrationen Milchsäure in zum Teil beträchtlicher Menge zum Verschwinden bringen kann". Er vermutet hierbei einen endothermen Übergang von Milchsäure in Kohlehydrat, wofür die nötige Energie durch nichtchemische Prozesse geliefert würde. Wenn sich diese Vermutung bewahrheiten sollte, könnte man einen ähnlichen Mechanismus auch im intakten Muskel voraussetzen, was eine weit-

[1] *Embden, Schmitz* und *Meinicke*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **113**, 46f., 1921 (Muskeln von phlorhizin- und strychninvergifteten Kaninchen); *Embden, Abraham* und *Lange*, ebendaselbst **136**, **311**, 1924 (Temporaria-Muskeln); *Embden, Deuticke, Lehnartz* und *Perger*, ebendaselbst **162**, 167, 1927 (Muskulatur von Schollen); *Martino*, ebendaselbst **163**, 172, 1927 (Forellen-Muskulatur); *Embden*, Handb. d. Physiol. VIII, 1, 430 ff.

[2] Handb. d. Physiol. 8, 1, 431.



gehende Umgestaltung unserer bisherigen Vorstellungen über den Erholungsvorgang zur Folge haben würde. Ich bin deshalb auf Vorschlag von Herrn *Meyerhof* an eine Nachuntersuchung dieser Beobachtung herangegangen.

Außer *Embden* haben auch *Beattie* und *Milroy*[1] ein Verschwinden von Milchsäure im Muskelbrei in Gegenwart von Fluorid beobachtet. Ganz besonders war dieses in Katzenmuskulatur nach Insulineinspritzung der Fall, wo in m/10 Fluoridlösungen die vorhandene Milchsäure fast vollständig verschwinden konnte. Immerhin haben die Autoren nicht unter anaeroben Bedingungen gearbeitet, so daß bei ihnen die Milchsäure eventuell durch Oxydation entfernt sein konnte. Andererseits beobachteten *Embden* und seine Mitarbeiter den Milchsäureschwund in der gleichen Versuchsanordnung nicht stets, sondern nur in einem Teil der Fälle und fanden auch, „daß während eines länger ausgedehnten derartigen Versuchs Anstieg und Absinken der Milchsäure miteinander abwechseln"[2]. Dies legte uns den Gedanken nahe, daß es sich bei dem Milchsäureschwund um einen methodischen Fehler handeln könnte.

Bereits in einigen orientierenden Versuchen war von Herrn *Meyerhof* gefunden, daß, wenn man in der üblichen Ausführung der Milchsäurebestimmungen den zur Entzuckerung benutzten Zusatz von Kupferkalk (nach *van Slyke* und *Clausen*) schon nach einer halben Stunde abfiltriert, in Gegenwart von Fluorid öfters erhebliche Milchsäureverluste auftreten, daß diese aber nahezu ausbleiben, wenn man den

Tabelle I.

Milchsäureverluste bei Fluoridzusatz zur Milchsäurebestimmung.

NaF im Bestimmungskolben	Milchsäure in mg		Verlust
Mol.	gefunden	vorgegeben	%
0	2,22	2,20	—
0,001	2,20	2,20	—
0,01	2,14	2,20	2,5
0,1	1,56	2,20	30,0
0	1,10	1,10	—
0,009	1,11	1,10	—
0,03	0,95	1,10	14,0
0,1	0,79	1,10	28,0

[1] Journ. of Physiol. **60**, 384, 1926; **62**, 174, 1927.
[2] *Embden*, Handb. d. Physiol. l. c.

Niederschlag über Nacht stehen läßt. Dieser Beobachtung bin ich weiter nachgegangen.

Setzt man Natriumfluorid direkt zur Milchsäure im Bestimmungskolben, so treten bedeutende Verluste auf, die schon bei n/10 Fluorid 30%, bei 0,03 n NaF über 10% betragen (Tabelle I).

Diese Verluste beruhen offenbar auf Verzögerung der Oxydation, da die durch Permanganat bedingte Rotfärbung viel langsamer verschwindet.

Ich untersuchte daher zunächst, ob der Kupferkalkzusatz das Fluorid nicht vollständig entfernt.

Es wurde in zwei Proben eine frische CaF_2-Fällung erzeugt durch Eingießen von 20 ccm n $CaCl_2$ in 15 ccm n NaF. Zu der einen gab ich 2 ccm Zinklactat, entsprechend 2,4 mg Milchsäure, zentrifugierte, filtrierte und benutzte einen aliquoten Teil zur Bestimmung (a). Die zweite Probe zentrifugierte ich erst und gab zu dem Filtrat 2 ccm Zinklactat, entsprechend 2,4 mg Milchsäure, und nahm hiervon ebenfalls einen aliquoten Teil zur Bestimmung (b). In Doppelbestimmungen ergab sich dann, umgerechnet auf die Gesamtmenge, das in Versuch 1 angegebene Resultat.

Versuch 1.

	Milchsäure in mg		Verlust
	gefunden	erwartet	%
a)	2,07 2,08	2,4	13
b)	2,36 2,38	2,4	—

Das zugesetzte Filtrat bedingte also hier bei der Milchsäurebestimmung keinen Fehler und war offenbar fluoridfrei. Dagegen ergab sich ein Verlust, wenn Zinklactat zum Calciumfluoridniederschlag gesetzt wurde. Dieser Befund, daß frisch gefälltes Calciumfluorid Milchsäure aus der Lösung entfernt, ließ sich unter verschiedenen Umständen bestätigen.

Z. B. wurde in einem hohen Standzylinder durch Eingießen von 40 ccm $CaCl_2$-Lösung in 30 ccm n NaF in Gegenwart von Zinklactat eine Calciumfluoridfällung hergestellt, dann die Suspension auf 100 ccm aufgefüllt. Nachdem sich eine scharfe Trennungslinie über dem Niederschlag gebildet hatte, wurde nach 1 und 4 Stunden ein Teil der klaren, überstehenden Lösung abfiltriert. Das Resultat ist in dem folgenden Versuch 2 enthalten.

Versuch 2.

Zeit	Milchsäure in mg		Verlust
	gefunden	vorgelegt	%
Nach 1 Std.	in 20 ccm 0,88	1,2	25
	„ 15 „ 0,75	1,02	25
„ 4 „	„ 20 „ 0,95	1,2	20
	„ 20 „ 0,97	1,2	20

Läßt man den Niederschlag einige Zeit stehen, so verringert sich der Gehalt des mitgefällten Lactats, wie sich aus der folgenden Versuchsreihe ergibt. In dieser wurde absichtlich mehr Fluorid zugesetzt, als in den gewöhnlichen Versuchen zugegen ist.

Je 25 ccm n $CaCl_2$-Lösung, die die in den einzelnen Versuchen angegebene Milchsäuremenge enthält, wird mit 20 ccm n NaF-Lösung unter Umschütteln versetzt und auf 50 ccm aufgefüllt. Nach einer bestimmten Zeit wird zentrifugiert. Der Gehalt des Niederschlags an Milchsäure wurde in der Weise bestimmt, daß in 25 ccm der klaren Lösung und ebenfalls in der restierenden 25-ccm-Lösung + Niederschlag die Milchsäure nach der Modifikation von *Shaffer*, *Cotonio* und *Friedemann*[1] bestimmt wurde. Diese ergibt nämlich im Gegensatz zur gewöhnlichen Bestimmung von *Fürth-Charnass* und *Clausen* in Gegenwart von Fluorid im Destillationskolben keinen Fehler. Aus der Differenz der beiden Werte mit und ohne Niederschlag ergibt sich der Gehalt des letzteren an Milchsäure. Es ist darauf hinzuweisen, daß gleichmäßige Resultate nur bei übereinstimmender Herstellung des Calciumfluoridniederschlags erhalten werden können.

Tabelle II.

Milchsäureverlust durch Mitreißen von Lactat im CaF_2-Niederschlag. Milchsäure in Milligrammen.

Dauer des Stehens	Theoretische Menge	In 25 ccm Lösung + Niederschlag gefunden	In 25 ccm überstehender Lösung	Danach berechnet		Summe	Verlust in der Lösung %
				im Niederschlag für sich	in gesamter Lösung		
20 Min.	2,0	1,28	0,67	0,61	1,34	1,95	34
20 „	2,0	1,28	0,68	0,60	1,36	1,96	34
25 „	1,0	0,67	0,31	0,36	0,62	0,97	37
25 „	2,0	1,30	0,60	0,68	1,22	1,90	35
25 „	4,0	2,65	1,19	1,45	2,38	3,82	38
72 Std.	2,0	1,06	0,86	0,20	1,72	1,92	10
48 „	2,0	1,14	0,88	0,25	1,77	2,02	12

[1] Journ. of biol. Chem. **78**, **335**, **1927**.

In einer Kontrollbestimmung wurde festgestellt, daß der Zusatz der gleichen Menge Calciumfluorid zum Destillationskolben belanglos ist. Aus der Tabelle II ergibt sich, daß bei nur 20 bis 25 Minuten langem Stehen des Niederschlags etwa 35% der Milchsäure aus der Lösung verschwinden, ein Resultat, das auffällig konstant ist trotz verschiedener zugesetzter Milchsäuremenge. Die fehlende Milchsäure ist aber vollständig im Niederschlag wiederzufinden. Nach 48 bzw. 72 Stunden langem Stehen ist die mitgerissene Menge auf ein Drittel verringert.

Während der durch das Mitreißen von Fluorid bedingte Fehler natürlich von der Bestimmungsmethode der Milchsäure unabhängig ist, wird der durch die Gegenwart des Fluorids im Destillationskolben verursachte bei der Modifikation nach *Shaffer* und Mitarbeitern vermieden, offenbar, weil das Mangansulfat die Oxydation des Lactats beschleunigt. Dies geht aus der Tabelle III hervor.

Tabelle III.

Milchsäurebestimmung nach *Fürth-Charnass* und *Shaffer* in Gegenwart von Natriumfluorid im Destillationskolben.

NaF-Gehalt im Destillierkolben Mol.	Milchsäure in mg		Methode	Defizit %
	theoretisch	gefunden		
0,17	2,0	1,97	*Shaffer*	0
0,17	2,0	2,02	„	0
0,17	2,0	1,05	*Fürth-Charnass*	45
0,17	2,0	1,28	„	35
0	2,0	1,97	*Shaffer*	0

Führt man Kontrollbestimmungen nach der Routinemethode aus, wobei man etwa eine solche Menge Fluorid zu der Zinklactatlösung hinzusetzt, wie bei den Muskelversuchen zugegen sein kann, und ebenso Kalk und Kupfersulfat in der üblichen Menge, so sind die Resultate weniger regelmäßig als in den voranstehenden Versuchen. Manchmal ergeben sich bei kurzem Stehen des Niederschlags Verluste, manchmal nicht; andererseits führt gelegentlich die ursprüngliche Bestimmungsmethode nach *Fürth-Charnass-Clausen* zu Verlusten, die aber bei der Modifikation nach *Shaffer* ausbleiben. Man kann daraus folgern, daß der scheinbare Schwund der Milchsäure in einigen Fällen durch Mitreißen von Lactat, in anderen durch Übergang von Fluorid in den Destillationskolben geschieht, und daß der Ausfall der Versuche offenbar von Zufälligkeiten bei der Herstellung der Fällung, der Filterdichte usw. abhängt.

Dieses Ergebnis stimmt recht gut zu den Resultaten *Embdens* und seiner Mitarbeiter, die ja nur in einem Teil ihrer Fälle einen Schwund von Milchsäure fanden und in manchen Versuchsreihen eine unregelmäßige Zu- und Abnahme. Im allgemeinen ist aber der Verlust an Milchsäure bei 24stündigem Stehen des Niederschlags sehr klein oder auch Null, und er wurde stets vermißt, wenn nach solcher Wartezeit die Bestimmung nach der *Shaffer*schen Modifikation geschah.

Schon ehe die für die Milchsäureverluste verantwortlichen Faktoren so weit aufgeklärt waren, habe ich die verschiedenen Anordnungen von *Embden* sowie *Beattie* und *Milroy* auf ein anaerobes Verschwinden von Milchsäure durchgeprüft. Stets wurde hierbei der Kupferkalkniederschlag eine Reihe von Stunden, meist über Nacht, stehengelassen und zur Sicherheit zur Anfangskontrolle vor der Verarbeitung ebensoviel Fluorid hinzugegeben, als in den Versuchslösungen verwandt war. Die Bestimmung geschah noch nicht nach der *Shaffer*schen Modifikation, und nach Kontrollbestimmungen zu urteilen, können Verluste von 7 bis 8% unter diesen Umständen noch gelegentlich auftreten. *In keinem einzigen Falle ergab sich dabei eine die Fehlergrenze überschreitende zeitliche Abnahme der Milchsäure.* Die Fehlergenauigkeit dieser Versuche ist etwas kleiner als die der direkten Milchsäurebestimmung. Insbesondere ist in den verschiedenen Proben zerschnittener Muskulatur der Gang der Milchsäurebildung niemals vollkommen gleich, so daß auch ohne Fluorid Unterschiede von 10% in Doppelversuchen möglich sind, was die Fehlergrenze der Milchsäurebestimmung selbst weit übertrifft.

Verfahren.

Die Muskeln wurden unter Eiskühlung mit gebogener Schere zerschnitten, auf der analytischen Wage zu Portionen von 1 g schnell abgewogen und in eisgekühlte Erlenmeyerkolben von 50 ccm eingeführt. Die Suspensionsflüssigkeiten waren vorher durch einstündiges Durchleiten von sauerstofffreiem Stickstoff von Sauerstoff befreit. Nach Einfüllen der Muskeln wurde die Luft aus dem Kolben durch kurzes Einleiten eines starken sauerstofffreien Stickstoffstromes vertrieben und der geschlossene Kolben in den Thermostaten (meist 20°) gehängt. Die Verarbeitung geschah wie üblich durch Enteiweißung nach *Schenck* und anschließende Kupferkalkfällung nach *van Slyke* und *Clausen*.

Auf diese Weise wurde die Milchsäurebildung in der Muskulatur von Temporarien, Kaninchen und Katzen mit Fluoridkonzentrationen zwischen 1 und 0,05 Mol. geprüft. Ohne Pufferung, durch Pufferung mit Phosphat oder Bicarbonat, durch Variation des p_H, durch Verwendung von Muskeln von mit Insulin vorbehandelten Kaninchen und Katzen und schließlich durch Verfolgung des Zeitverlaufs der Milchsäurebildung bei hohen Fluoridkonzentrationen versuchte ich

vergeblich, den von *Embden* und seinen Mitarbeitern mitgeteilten Befund zu reproduzieren. Über die Versuche geben die folgenden Tabellen Auskunft.

Tabelle IV.

Verhalten der Milchsäure unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Fluorid. Temperatur 20°.

Nr.	Muskelart	Zusätze	Versuchsdauer Std.	Molare Fluoridkonzentration	Milchsäure gefunden %	Änderung gegen Anfangswert %
1.	Temporaria	—	0	—	0,163	
		—	2	1	0,171	+ 5
		—	2	0,5	0,169	+ 4
		—	2	0.25	0,177	+ 9
		—	2	0.12	0,177	+ 9
		—	2	0,06	0,181	+ 11
2.	Kaninchenmuskeln	—	0	—	0,338	
		—	$1^1/_2$	1	0,311	— 8
		—	$1^1/_2$	0,5	0,338	0
		—	1	0,25	0,341	+ 1
		—	1	0,12	0,348	+ 3
		—	1	0,06	0,383	+ 13
3.	Kaninchen mit Krampfdosis Insulin gespritzt	—	0	—	0,339	
		0,01 m Phosphat	0	—	0,316	
		—	3	1	0 306	— 6
		0,01 m Phosphat	3	1	0,306	— 6
		—	3	0,33	0,321	— 2
		0,01 m Phosphat	3	0,33	0,337	+ 3
		—	3	0,1	0,310	— 5
		0,01 m Phosphat	3	0,1	0,328	0

In den Versuchen der folgenden Tabellen sind stets Doppelbestimmungen der Milchsäure ausgeführt, deren größte Differenz 6 bis 7 % beträgt. In keinem Falle ergibt sich eine diese Schwankungsbreite überschreitende Abnahme der Milchsäure durch Fluoridzusatz.

Versuch 3.

Variation des p_H.

Kaninchen mit Krampfdosis Insulin (*Leo*) gespritzt, nach 3 Stunden durch Entbluten getötet, keine Krämpfe; Blutzucker 0,056 und 0,060. Dauer: 3 Stunden; Temperatur: 20°. Milchsäuregehalt in Prozenten.

Datum		Anfangswert	p_H 6,8	p_H 10,8
11. V.	m/5 Na F + Phosphatpuffer	0,287 0,271	0,284 0,281	0,278 0,275

Tabelle V. Prozente Milchsäure zu verschiedenen Zeiten bei Gegenwart von Fluorid. Temperatur: 20°.

Datum	Muskelart	NaF konz.	0 Std.	1 Std.	2 Std.	4 Std.	Größte Milchsäureabnahme %
19. IV.	Temporarienmuskel	m/1	0,260 0,269	0,280 0,278	0,265 0,283	0,286 0,287	0
20. IV.	Kaninchenmuskel	m/1	0,495 0,462	0,502 0,475	0,502 0,508	0,493 0,515	0
6. V.	Kaninchen mit Insulin gespritzt*	m/10	0,280 0,295	0,284 0,297	0,305 0,280	0,281 0,272	— 4

* Erhielt Krampfdosis Insulin, nach 3 Stunden durch Entbluten getötet; leichte Krämpfe Blutzucker 0,027, 0,029.

Versuch 4. Kaninchenmuskulatur. Temperatur: 37°.

Datum		Anfangswert	15 Min.	30 Min.	60 Min.	Größte Abnahme %
25. IV.	Mol. NaF . .	0,537	0,545	0,543	0,570	0
	Mol. NaF + 2% $NaHCO_3$	0,510	0,551	0,540	0,533	0

Versuch 5. Katze, mit Krampfdosis Insulin gespritzt, nach 3 Stunden getötet. Krämpfe. Temperatur: 20°.

Datum		Anfangswert	2½ Std.	Größte Milchsäureabnahme %
17. V.	Mol. NaF	0,470 0,471	0,449 0,470	— 2

Ich schließe somit, daß auch in Gegenwart von Fluorid Milchsäure niemals anaerob aus zerschnittener Mukulatur verschwindet, und daß die gegenteiligen Angaben der Autoren auf durch Fluorid veranlaßte Milchsäureverluste bei der Verarbeitung zurückzuführen sind.

Der Gedanke, daß unter Fluoridwirkung im zerschnittenen Muskel Milchsäure anaerob in Kohlehydrat überführt werden könnte, ist um so mehr von der Hand zu weisen, als weitere Versuche, die in Gegenwart von Sauerstoff ausgeführt wurden, ergaben, daß Fluorid die in atmendem Muskelgewebe stattfindende Resynthese zu Kohlehydrat vollständig verhindert, und zwar unter Umständen, unter denen energetisch eine solche Synthese möglich sein würde. Diese Versuche werden demnächst in einem anderen Zusammenhang mitgeteilt. Jedoch bedarf ein solcher Gedanke nach meinen oben mitgeteilten Versuchen keiner weiteren Erörterung.

Über die partielle De-phosphorylierung der Hexose-di-phosphorsäure durch Hefe.

Von

C. Neuberg und **J. Leibowitz.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Vor einiger Zeit[1] konnten wir zeigen, daß die *Spaltung der Hexose-di-phosphorsäure durch die Phosphatase des Aspergillus oryzae über* die Zwischenstufe einer *Hexose-mono-phosphorsäure* verläuft, die mit der vor Jahren von *Neuberg* durch chemischen Abbau des Di-phosphats gewonnenen Hexose-mono-phosphorsäure identisch zu sein schien. Bei dieser Gelegenheit hatten wir bereits hervorgehoben, daß Hefen-phosphatase ähnlich wirkt. Besonders wichtig war es nun, festzustellen, ob dieser biologisch beachtliche *Abbau des Zymo-di-phosphats durch Hefe*, der gleichfalls absatzweise erfolgt, über dasselbe Intermediärprodukt vor sich geht.

Wir nahmen zunächst Versuche mit gärfähigem Mazerationssaft vor. Bisher glückte es in keinem früheren Stadium des Abbaues, nennenswerte Mengen Hexose-mono-phosphat aus dem Reaktionsgemisch zu isolieren. Dieses Ergebnis ist nicht unerwartet, da Versuchen von *C. Neuberg* und *M. Kobel*[2] entnommen werden kann, daß die Mono-phosphate mit mindestens der gleichen Geschwindigkeit wie das Zymo-di-phosphat vergoren, also wohl auch de-phosphoryliert werden, demzufolge ihre Anhäufung als Reaktions-zwischenprodukt nicht möglich wäre.

Dagegen gelingt die *Abfassung einer Hexose-mono-phosphorsäure als Abbauprodukt des Di-phosphats* bei Verwendung von frischer Hefe, deren Gärkraft durch Antiseptika aufgehoben bzw. stark herabgedrückt worden ist. Bei Benutzung von chloroformierter und toluolisierter *Unterhefe* konnten nach Aufarbeitung der Ansätze in der bei unseren Taka-phosphatase-versuchen ehedem beschriebenen Weise Präparate

[1] *C. Neuberg* und *J. Leibowitz*, diese Zeitschr. **187**, 481, 1927.

[2] *C. Neuberg* und *M. Kobel*, ebendaselbst **174**, 480, 1926; **179**, 451, 1926.

von Bariumsalzen gewonnen werden, deren Zusammensetzung und Löslichkeitsverhältnisse mit denen eines hexose-mono-phosphorsauren Bariums übereinstimmen. Auffallenderweise waren nun die Drehwerte durchweg höher, als sie für den reinen *Neuberg*-ester angegeben werden, andererseits aber beträchtlich niedriger als den Daten für den *Robison*-ester entspricht. Da auch das (freilich weniger charakteristische) Reduktionsvermögen zwischen den Werten für die beiden Mono-phosphate lag, dürfte es sich um Gemenge der beiden handeln. Es lag nahe, anzunehmen, daß die Uneinheitlichkeit des Reaktionsproduktes darauf zurückzuführen wäre, daß es zum Teil aus einem Produkt der partiellen De-phosphorylierung des Di-phosphats, und zu einem anderen Teile aus einem Produkt der Re-phosphorylierung total abgespaltener Hexose besteht.

Wir stellten daher De-phosphorylierungs-versuche mit frischer *Oberhefe* an, der kein nachweisliches Phosphorylierungs-vermögen zukommt; ihre Gärwirkung war durch Zugabe von Chloroform plus Toluol aufgehoben. Im Gegensatz zu unserer Erwartung erwies sich auch der hier gewonnene Mono-phosphorsäure-ester nach seiner Drehung als ein Gemisch von *Neuberg*- und *Robison*-ester. Wir überzeugten uns davon, daß der hohe Ablenkungswert nicht etwa durch geringe Mengen stark drehender Verunreinigungen, welche die analytischen Werte nicht beeinflussen, bedingt ist, indem wir ein so gewonnenes Mono-phosphat-präparat durch Fällung mit Quecksilber-acetat nach *Robison* von einer anhaftenden kleinen Menge stickstoffhaltiger Substanz befreiten. Es erfolgte keine Abnahme, eher eine geringe Zunahme des Drehungsvermögens.

Unter diesen Umständen müssen wir auch einem Ergebnis unserer Taka-phosphatase-versuche stärkere Beachtung zuteil werden lassen. Dort haben wir nämlich ebenfalls bereits Drehungen gefunden, die höher lagen, als zu erwarten war. Wir schenkten diesem Umstande keine besondere Aufmerksamkeit; im Lichte der neuen Erfahrungen betrachtet, scheint es sich jedoch nicht um einen Zufall zu handeln.

Unsere Ergebnisse sind wohl mit einer von *O. Meyerhof* und *K. Lohmann*[1] für die biologische Rolle der Hexose-mono-phosphorsäure gemachten Annahme in Einklang zu bringen. Die Autoren haben nicht den Mechanismus der De-phosphorylierung des Zymo-di-phosphats untersucht, vielmehr umgekehrt die Bildung von typischem Di-phosphorsäure-ester bei der Glykolyse und Gärung auf eine Umwandlung eines primär gebildeten Mono-phosphats bezogen, von dem je 2 Mol. derart reagieren sollen, daß das eine vollkommen de-phos-

[1] *O. Meyerhof* und *K. Lohmann*, diese Zeitschr. 185, 113, 1927.

phoryliert wird, während das andere den abgespaltenen Phosphorsäure-rest aufnimmt und so zum Di-phosphat wird. Die beiden von *Neuberg* und *Robison* aufgefundenen und in Substanz isolierten Monoester sehen sie nicht als einheitliche Produkte an, sondern als Gemische von Isomeren, die sich teils von einer Aldo-, teils von einer Ketohexose ableiten. Es muß auch berücksichtigt werden, daß ein ganz sicherer Anhaltspunkt zur Beurteilung völliger Einheitlichkeit der Hexose-di-phosphorsäure bisher fehlt[1]. Immerhin ist es unzweifelhaft, daß im Produkt der partiellen enzymatischen De-phosphorylierung der Hexose-di-phosphorsäure der *Neuberg*-ester stark überwiegt, da es uns, wie früher beschrieben, gelungen ist, das kristallisierte Strychninsalz durch einmaliges Umkristallisieren rein zu erhalten.

Die partielle De-phosphorylierung der Zymo-di-phosphorsäure durch tierische Organe haben wir bereits erfolgreich durchgeführt (siehe S. 456); Versuche mit Bakterien sind im Gange.

Beschreibung der Versuche.

Als Substrate benutzten wir Magnesium-hexose-di-phosphat, das nach *Neuberg* und *Sabetay*[2] bereitet war, oder das entsprechende Kaliumsalz, dargestellt durch Schütteln des reinen Calciumsalzes mit einer berechneten Menge Kalium-oxalat-lösung. Mit jedem Hauptversuch wurde ein Kontrollansatz verbunden, in dem die gleiche Menge Hefe in demselben Volumen Chloroform-Toluol-wasser aufgeschwemmt war. In Proben beider Ansätze nahmen wir die Messung der Phosphorsäure-abspaltung kolorimetrisch vor, wobei die (stets sehr geringen) P_2O_5-Werte des Kontrollansatzes von den Ergebnissen des Hauptversuchs abgezogen wurden.

Die Aufarbeitung, d. h. die Isolierung des erzeugten Mono-phosphorsäure-esters, konnte in der einfachen Weise geschehen, die wir bei unseren Versuchen mit Taka-phosphatase bewährt gefunden hatten. Die hierbei gewonnenen Bariumsalze wurden so lange aus wässeriger Lösung mit Alkohol umgefällt, bis sie in kaltem und heißem Wasser vollständig löslich waren. Sie enthielten nur Spuren mittels der *Lassaigne*schen Probe nachweisbarer stickstoffhaltiger Materie.

---

[1] Aus der Natur der bei der Spaltung von Hexose-phosphorsäureestern gewonnenen Zucker dürfen keine Schlüsse auf die Natur des Zuckers im veresterten Zustande gezogen werden, da nach den neuesten Untersuchungen über Bildung und Verseifung von Phosphorsäure-estern (vgl. *R. Robinson*, Nature **120**, 44, 1927; *W. N. Haworth*, Journ. Soc. chem. Ind. **46**, T, 295, 1927) Umlagerungen sterischer Art selbst bei Verbindungen von stabiler Konstitution nicht unwahrscheinlich sind.

[2] *C. Neuberg* und *S. Sabetay*, diese Zeitschr. **161**, **240**, 1925.



Versuch 1.

11,6 g Magnesiumsalz, 25 g Unterhefe (*Schultheiß-Patzenhofer*), 250 g Wasser, je 5 ccm Chloroform und Toluol.

Zeit in Stunden	Freies P_2O_5 in g	Freies P_2O_5 in % des Gesamt-P_2O_5
0	Spur	—
18	0,69	16

Ausbeute an Ba-Hexose-monophosphat 0,6 g = 17% der Theorie.

0,3922 g Ba-Salz[1] (= 0,2580 g Säure) wurden in 1,99 ccm n HCl gelöst und auf 10,0 ccm aufgefüllt. $[\alpha]_D = +7{,}0^0$ ($\alpha = +0{,}36^0$, $c = 2{,}58$, $1 = 2$).

3,0 ccm dieser Lösung (= 0,1177 g Substanz) lieferten 0,7020 g $BaSO_4$.

5,0 ccm (= 0,1961 g Substanz) ergaben nach der Veraschung 0,0530 g $Mg_2P_2O_7$.

$C_6H_{11}O_9PBa$ (395,5). Ber.: 34,7 % Ba, 7,8 % P;
gef.: 35,1 % Ba, 7,5 % P.

Versuch 2.

14,8 g K-Salz, 30 g Unterhefe, 250 ccm Wasser, je 5 ccm Chloroform und Toluol.

Zeit in Stunden	Freies P_2O_5 in g	Freies P_2O_5 in % des Gesamt-P_2O_5
0	0	0
14	0,68	16
24	0,89	21

Nach 14 (Nr. 1) und nach 24 Stunden (Nr. 2) gelangten je 125 ccm zur Aufarbeitung. Ausbeuten aus Nr. 1: 0,2 g, aus Nr. 2: 0,3 g Ba-Salz.

0,3105 g (= 0,2042 g Säure) wurden in 1,60 ccm n HCl gelöst und auf 10,0 ccm aufgefüllt. $[\alpha]_D = +5{,}1^0$ ($\alpha = +0{,}21^0$, $c = 2{,}042$, $1 = 2$).

Aus 3,0 ccm dieser Lösung = 0,0931 g Substanz wurden 0,0542 g $BaSO_4$ erhalten.

$C_6H_{11}O_9PBa$. Gef.: 34,3 % Ba; ber.: 34,7 % Ba.

Reduktionsprobe. 0,0391 g Ba-Salz verbrauchten bei der Bestimmung nach *Auerbach-Bodländer* 0,62 ccm n/10-J, entsprechend 31 % des Reduktionsvermögens der äquivalenten Menge Aldohexose.

[1] Hier wie überall im Hochvakuum über P_2O_5 entwässert.

Versuch 3.

11,6 g Mg-Salz, 25 g Oberhefe (*Sinner*), 250 ccm Wasser, je 5 ccm Chloroform und Toluol.

Zeit in Stunden	Freies P_2O_5 in g	Freies P_2O_5 in $^0/_0$ des Gesamt-P_2O_5
0	0	0
18	1,28	30

Ausbeute: 0,6 g Ba-Salz = 9 % der Theorie.

0,4227 g (= 0,2780 g Säure) in 2,08 ccm n HCl, auf 10,0 ccm aufgefüllt. $[a]_D = + 6{,}7^0$ ($a = + 0{,}37^0$, $c = 2{,}78$, $1 = 2$).

3,0 ccm dieser Lösung (= 0,1268 g Substanz) lieferten 0,0734 g $BaSO_4$, entsprechend 34,1 % Ba.

Versuch 4.

15,4 g Mg-Salz, 40 g Oberhefe, 250 ccm Wasser, je 5 ccm Chloroform und Toluol.

Zeit in Stunden	Freies P_2O_5 in g	Freies P_2O_5 in $^0/_0$ des Gesamt-P_2O_5
0	0	0
15	1,43	26
24	1,65	29

Wie man sieht, schreitet unter den von uns befolgten Arbeitsbedingungen, d. h. bei Anwendung von viel Toluol plus Chloroform, die partielle De-phosphorylierung nur langsam fort. Es ist möglich, daß bei Variierung der Versuche bessere Ausbeuten erzielt werden; diese sind in Wirklichkeit bei der Unvollkommenheit der Trennungsmethode von Mono- und Di-phosphat höher zu veranschlagen. In Versuch 4 erhielten wir *1,2 g Barium-hexose-monophosphat* = 14 % der Theorie.

0,2900 g (= 0,1908 g Säure) in 1,49 ccm n HCl, auf 10,0 ccm aufgefüllt. $[a]_D = + 9{,}4^0$ ($a = + 0{,}36^0$, $c = 1{,}908$, $1 = 2$).

3,0 ccm dieser Lösung (= 0,0870 g Substanz) lieferten 0,0505 g $BaSO_4$, entsprechend 34,2 % Ba.

0,9 g wurden in Wasser gelöst, mit Hg-Acetat gefällt und nach dem Filtrieren über das basische Pb-Salz in das Ba-Salz zurückverwandelt.

Wiedergewonnen: 0,6 g.

0,3214 g Ba-Salz (= 0,2113 g Säure) mit 1,63 ccm n HCl und H_2O zu 10,0 ccm gelöst. $[\alpha]_D = +10{,}6^0$ ($\alpha = +0{,}45^0$, $l = 2$, $c = 2{,}113$).

3,0 ccm (= 0,0964 g Substanz) lieferten 0,0570 g $BaSO_4$.

6,0 ccm (= 0,1928 g Substanz) lieferten nach der Veraschung 0,0532 g $Mg_2P_2O_7$.

0,2145 g lieferten bei der Elementaranalyse (mit Bichromat) 0,1396 g CO_2 und 0,0598 g H_2O.

$C_6H_{11}O_9PBa$. Ber.: 18,21 % C, 2,80 % H, 34,74 % Ba, 7,85 % P;
gef.: 17,86 % C, 3,12 % H, 34,80 % Ba, 7,69 % P.

Also auch die Kohlenstoff-Wasserstoff-Analyse tut — gleich den Bestimmungen der Mineralbestandteile — einwandfrei das Vorliegen des Hexose-mono-phosphorsäure-esters dar.

Abbau von Zymo-di-phosphat mittels tierischer Phosphatase zu Hexose-mono-phosphorsäure-ester.

Von

C. Neuberg und **J. Leibowitz.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Läßt man einen verdünnten Auszug frischer *Pferdenieren* auf eine Zymo-di-phosphat-lösung bei 37⁰ einwirken und unterbricht die Spaltung, nachdem etwa die Hälfte der veresterten Phosphorsäure in Freiheit gesetzt ist, so enthält die Reaktionsflüssigkeit neben unverändertem Ausgangsmaterial und anorganischem Phosphat reichliche Mengen eines partiell de-phosphorylierten Produkts. Wir isolierten es auf die bequeme Art, die bei Beschreibung unserer Versuche mit Taka-phosphatase[1] sowie mit Hefe[2] angegeben ist, und konnten es zu unserer Überraschung als ziemlich reinen *Robison*schen Hexose-mono-phosphor-säure-ester identifizieren.

Das rohe wasserlösliche Bariumsalz von angenähert richtiger Zusammensetzung, das wir in einer Ausbeute von 30% der Theorie erhielten, zeigte — in der äquivalenten Menge Salzsäure gelöst — eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D = +21^0$. Nach der Reinigung, die durch Fällung mit Mercuri-acetat vorgenommen wurde, stieg die Drehung der nunmehr völlig N-freien Substanz auf $+23^0$ an und sie unterschied sich somit nicht mehr wesentlich von den durch direkte Mono-phosphorylierung freier Hexosen mittels Hefe dargestellten Präparaten.

Durch Umsetzung des Ba-Salzes mit Strychninsulfat gewannen wir das kristallisierte Strychninsalz ($[\alpha]_D = -23^0$ in 50%igem Alkohol) in einer Ausbeute von 40% der Theorie, identisch mit dem von uns früher[3] dargestellten Strychninsalz des *Robison*-esters ($[\alpha]_D = -22^0$) und deutlich verschieden von dem von *C. Neuberg* und *O. Dalmer* beschriebenen Strychninsalz der isomeren Hexose-mono-phosphorsäure ($[\alpha]_D = -30^0$), von der unsere Verbindung auch mit ihrem anderen hier erstmalig ermittelten Kristallwassergehalt abwich.

Schließlich wurde noch das *Strychninsalz in das Ba-Salz zurückverwandelt*; die aus dem regenerierten Ba-Salz in Freiheit gesetzte Säure wies $[\alpha]_D = +27^0$ auf.

---

[1] *C. Neuberg* und *J. Leibowitz*, diese Zeitschr. **187**, 481, 1927.
[2] *Dieselben*, ebendaselbst **191**, 450, 1927.
[3] *Dieselben*, ebendaselbst **184**, 489, 1927.

Ein Toluolwasser-auszug aus *Pferdeleber* zeigte nur eine geringe phosphatatische Aktivität; nach dreitägiger Einwirkung waren erst 15% des Gesamt-P abgespalten, so daß wir den Versuch abbrachen.

Der Nachweis des *Robison*-esters als Hydrolysenprodukt des Zymo-di-phosphats ist theoretisch bemerkenswert. Bei der Einwirkung von Hefe auf Phosphorsäure-ester stellt der Phosphatase-effekt ein Glied in der Kette von Reaktionen dar, die zum Teil miteinander gekoppelt sind und die auch beim Zusammenbringen der Hefe mit Chloroform oder Toluol nur unvollständig gehemmt werden. Die Produkte der partiellen De-phosphorylierung mit Hefe erwiesen sich bei unseren Versuchen als Gemische der beiden isomeren Hexosen-mono-phosphate von wechselnder Drehung. Weniger wahrscheinlich, wenn auch noch nicht völlig auszuschließen ist es, daß bei der Einwirkung des Nierenextrakts andere fermentative Vorgänge außer der einfachen Spaltung den Kohlehydrat-di-phosphorsäure-ester betreffen. Trotzdem entsteht aus dem ausgesprochenen ketosidischen Zucker ein solcher von anscheinend aldosidischer Natur. Diese selbsttätige Umlagerung stützt die schon schon vor langem[1] ausgesprochene Vermutung, daß den Zymophosphaten nicht normale Glucose oder Fructose zugrunde liegt, sondern labile Zuckerformen, deren Struktur nur durch die Veresterung aufrechterhalten wird. In diesem Zusammenhange sei der von *Morgan*[2] dargestellten Methyl-glykoside (α- und β-Form) der Hexose-di-phosphorsäure gedacht. Nach ihrem Verhalten bei der Säurehydrolyse und gegen Fermente könnte man an einen Zusammenhang mit dem bekannten γ-Fructosid (aus Rohrzucker, Inulin usw.) glauben; allerdings kann die gewählte Methodik auch von stabilen Hexosen aus zu den sogenannten γ-Glykosiden führen.

Wir haben (l. c.) bereits hervorgehoben, daß man mit dem Auftreten des *Neuberg*schen und *Robison*schen Mono-phosphorsäure-esters im Tierkörper zu rechnen haben wird, nachdem wir die enzymatische wie rein chemische Abspaltung einer Phosphorsäure-gruppe aus dem Di-phosphat nachgewiesen hatten. Auch *Robison*[3] hat, ohne ein Produkt der partiellen De-phosphorylierung zu isolieren, auf Grund der Reaktionskinetik der Knochenphosphatase an die Möglichkeit eines solchen Vorgangs gedacht. Die hier von uns beschriebenen Versuche mit animalischer Phosphatase erbringen den Beweis für den Vollzug der enzymatischen Überführung von Di-phosphat in den Mono-phosphorsäure-ester.

---

[1] *C. Neuberg*, Die Gärungsvorgänge. Monogr. Jena, 1913, S. 13.

[2] *W. T. J. Morgan*, Biochem. Journ. 21, 675. 1927; vgl. auch *H. H. Schlubach* und *W. Rauchenberger*, B. 60, 1178, 1927.

[3] *R. Robison*, Biochem. Journ. 17, 286, 1923.

Beschreibung der Versuche.

Frische Pferdeniere wurde enthäutet, mechanisch so weit wie möglich von Fett befreit und in der Fleischhackmaschine zerkleinert. 300 g des erhaltenen Breies wurden mit 1 Liter Toluolwasser zunächst einige Stunden bei Zimmertemperatur, darauf über Nacht im Eisschrank mazeriert.

250 ccm des durch Zentrifugieren geklärten Saftes wurden mit einer Lösung von 15,4 g reinem, hexose-di-phosphorsaurem Magnesium in 50 ccm Wasser und 5 ccm Toluol versetzt (Ansatz 1).

Als Kontrollversuche stellten wir an: 25 ccm Wasser, 5 ccm der Magnesium-di-phosphat-lösung, 0,5 ccm Toluol (Ansatz 2); ferner 25 ccm Nierensaft, 5 ccm Wasser, 0,5 ccm Toluol (Ansatz 3).

Die Bestimmung der freien bzw. abgespaltenen Phosphorsäure erfolgte kolorimetrisch in Proben, die wir aus den umgeschüttelten Flüssigkeiten entnahmen und in Trichloressigsäure einlaufen ließen. Zu Beginn des Versuchs enthielt Ansatz 1 pro Kubikzentimeter 8,2 mg Ester-P (festgestellt nach Veraschung), die gleich Gesamt-P zu setzen ist, da nur eine zu vernachlässigende Spur freien Phosphats nachzuweisen war. Nach 44stündigem Stehen bei 37° war in Ansatz 1 pro Kubikzentimeter 3,6 mg freier P zugegen, die Kontrollansätze enthielten zusammen 0,1 mg freien P pro Kubikzentimeter, also waren 3,5 mg = 43 % des Gesamt-P abgespalten.

Die Aufarbeitung des Versuchs und Isolierung des gebildeten Mono-phosphorsäure-esters erfolgte wie üblich. Vor der ersten Neutralisation der sauren Lösung mit Baryt wurde mit Äther ausgeschüttelt, um eventuell aus dem tierischen Material in die Lösung übergegangene Fettsäuren zu entfernen.

Die Ausbeute an weißem, leicht löslichem Bariumsalz des Monophosphats belief sich auf 4,3 g = 30 % der Theorie; die *Lassaigne*sche Probe war schwach positiv.

0,4095 g Ba-Salz, getrocknet bei 66°/0 mm, (= 0,2694 g Säure) wurden mit 2,08 ccm n HCl zu 10,0 ccm gelöst.

$[\alpha]_D = + 21,3^0$ ($\alpha = + 1,15^0$, $l = 2$, $c = 2,694$).

3,0 ccm dieser Lösung (= 0,1228 g Substanz) lieferten 0,0711 g $BaSO_4$ = 34,1 % Ba. $C_6H_{11}O_9 . PBa$. Ber.: 34,7 %.

Reduktionsvermögen nach *Auerbach-Bodländer*: 0,0752 g Ba-Salz (enthaltend 34,2 mg Hexose) verbrauchten 1,90 ccm n/10 J = 50 % des Reduktionsvermögens einer Aldohexose.

3,7 g des rohen Ba-Salzes wurden zwecks Reinigung in 40 ccm 10 %igen Alkohols gelöst. Wir versetzten die klare Flüssigkeit tropfenweise mit einer konzentrierten Quecksilberacetat-lösung, solange sich noch ein Niederschlag bildete; es wurden nur wenige Tropfen verbraucht. Nach längerem Stehen wurde filtriert und aus der Lösung

das Bariumsalz auf dem Umwege über das basische Bleisalz wiedergewonnen; Ausbeute 2,8 g.

0,4713 g Ba-Salz (= 0,3101 g Säure) mit 2,39 ccm n HCl zu 10,0 ccm gelöst.

$[\alpha]_D = +23,1^0$ ($\alpha = +1,43^0$, $l = 2$, $c = 3,101$).

3,0 ccm der Lösung (= 0,1414 g) lieferten 0,0830 g $BaSO_4$ = 34,5 % Ba; 5,0 ccm (= 0,2356 g) lieferten nach der Veraschung 0,0659 g $Mg_2P_2O_7$ = 7,8 % P. (Berechnet werden: Ba = 34,75 %, P = 7,85 %.)

Reduktionsvermögen: 0,0947 g Ba-Salz verbrauchten 2,52 ccm n/10 J = 53 % R_{Aldose}.

Strychninsalz der Hexose-mono-phosphorsäure.

2 g Bariumsalz in 25 ccm Wasser wurden mit einer heißen Lösung von 4,2 g Strychninsulfat in 100 ccm 40 %igem Alkohol versetzt. Nach dem Erkalten filtrierten wir vom Bariumsulfat ab und dunsteten die noch eine Spur Ba-Ionen enthaltende Lösung zur Trockne ein. Der halbkristallisierte Rückstand wurde in siedendem wässerigen Alkohol gelöst; aus der filtrierten Lösung schieden sich nach 24stündigem Stehen im Eisschrank wohl-ausgebildete Kristalle aus, die abgesaugt, mit wässerigem und absolutem Alkohol sowie mit Äther gewaschen und an der Luft bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurden; Ausbeute 1,8 g.

0,3470 g Substanz verloren beim Trocknen über P_2O_5 im Hochvakuum bei 78^0 0,0354 g H_2O.

$(C_{21}H_{22}N_2O_2)_2 \cdot C_6H_{13}O_9P \cdot 6\,H_2O$. Ber.: H_2O = 10,4 %; gef.: H_2O = 10,2 %.

0,3090 g der *entwässerten* Substanz wurden in 5,0 ccm Alkohol + 5,0 ccm Wasser gelöst.

$[\alpha]_D = -23,5^0$ ($\alpha = -1,45^0$, $c = 3,09$, $l = 2$).

7 ccm (= 0,2163 g Substanz) lieferten bei der Phosphorbestimmung 0,0243 g $Mg_2P_2O_7$ = 3,1 % P.

$C_{21}H_{22}N_2O_2 \cdot C_6H_{13}O_9P$. Ber.: 3,3 % P.

1,4 g Strychninsalz wurden durch Zerlegen mit Barytwasser in das Bariumsalz zurückverwandelt. Nach zweimaligem Umfällen aus wässeriger Lösung mittels Weingeist betrug die Ausbeute an reinem Bariumsalz 0,25 g.

0,2087 g (getrocknet bei 78^0/0 mm) mit 1,06 ccm n HCl auf 10,0 ccm aufgefüllt.

$[\alpha]_D = +26,3^0$ ($\alpha = +0,74^0$, $c = 1,378$, $l = 2$).

5,0 ccm der Lösung (= 0,1043 g) lieferten 0,0620 g $BaSO_4$ = 34,9 % Ba.

$C_6H_{11}O_5 \cdot PO_4Ba$. Ber.: Ba 34,75 %.



Arsenat-aktivierung und die Spezifität von Phosphatase.

Von

C. Neuberg und **J. Leibowitz.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Vor mehr als 20 Jahren fanden *Harden* und *Young*[1], daß ein Zusatz von Arsenat die Spaltung des Zuckers durch Hefe stark stimuliert. Sie nahmen an, daß von allen an der Reaktionsfolge der Gärung beteiligten enzymatischen Prozessen speziell die totale Hydrolyse des intermediär gebildeten Hexose-di-phosphorsäure-esters durch das Arsenat aktiviert wird, und stützten diese Meinung durch mehrere indirekte Beweise[2]. Dieser Ansicht über das Wesen der Arsenataktivierung schloß sich auch *Meyerhof*[3] an. *Neuberg* und *Kobel*[4] haben gezeigt, daß Arsenat auf den entgegengesetzten Vorgang, die zymochemische Zucker-phosphorylierung, erheblich hemmend wirkt. Ein definitiver Beweis dafür, daß Arsenat ein Aktivator der Phosphatase ist, scheint jedoch bisher nicht erbracht worden zu sein.

Wir untersuchten daher den Einfluß von Arsenat auf die *Spaltung des Zymo-di-phosphats durch Hefe in Gegenwart von Chloroform und Toluol* unter Bedingungen, die — wie wir uns durch Kontrollversuche überzeugten — eine Gärung ausschlossen. In Übereinstimmung mit der von den oben genannten Autoren geäußerten Ansicht ergab sich eine gewaltige Beschleunigung der Phosphorsäure-abspaltung; im Höchstfalle war die Aktivität der Phosphatase auf das Fünffache gesteigert.

Eine wesentlich geringere, aber immer noch deutliche Aktivierung durch Arsenat erfuhr auch die *Taka-phosphatase* in ihrer Einwirkung auf *Hexose-di-phosphat*. Dagegen verhielt sich die sehr energische

---

[1] *A. Harden* und *W. J. Young*, Proc. Chem. Soc. **22**, 283, 1906.

[2] *Dieselben*, Proc. Roy. Soc. (B) **83**, 451, 1911.

[3] *O. Meyerhof*, H. **102**, 208, 1918.

[4] *C. Neuberg* und *M. Kobel*, diese Zeitschr. **174**, 493, 1926.



Nieren-phosphatase in ihrem natürlichen Zustand gegen geringe Arsenatzusätze völlig indifferent, während höhere Konzentrationen, welche die Hefe stark aktivieren, hier leicht hemmend wirken[1].

Diese Befunde sprechen für die Ansicht, daß es mindestens zwei spezifisch verschiedene Phosphatasen gibt. An Wahrscheinlichkeit gewinnt diese Vermutung, wenn man mit dem Effekt des Arsenats auf die Phosphorsäure-abspaltung die chemische Natur der Produkte in Beziehung bringt, die bei dem von uns durchgeführten partiellen Abbau des Zymo-di-phosphats mittels verschiedener Phosphatasen entstehen. Hierbei lieferte die durch Arsenat aktivierbare Taka-phosphatase ganz überwiegend den *Neuberg*-ester ($[\alpha]_D = + 2$ bis 4^0)[2], die Nieren-phosphatase den praktisch reinen *Robison*-ester ($[\alpha]_D = + 27^0$)[3]. Ein starkes Argument für den Zusammenhang zwischen Arsenat-aktivierung und Mechanismus der De-phosphorylierung liegt im Verhalten der Hefe. Ohne Arsenat-zusatz erhielten wir dabei[4] als Produkte der partiellen Di-phosphat-hydrolyse stets Gemische der beiden in Frage kommenden Mono-phosphate. Da eine gegenseitige Umwandlung der hoch- und niedrigdrehenden Isomeren ineinander bisher nicht beobachtet worden ist, lag es nahe, an ein Nebeneinanderwirken beider Ab- bzw. Umbau-mechanismen zu denken. Wir haben deshalb Versuche an Zymo-di-phosphat mit arsenat-aktivierter Hefe unternommen, um zu prüfen, ob jetzt nur eine Reaktionsrichtung begünstigt werden würde. In Übereinstimmung mit unseren Vorstellungen erwies sich das hierbei isolierte Abbau-zwischen-produkt nach Drehung und Reduktionsvermögen als angenähert reiner *Neuberg*-ester[5].

Man gelangt somit zu dem interessanten Ergebnis, daß manche Organismen zwei spezifisch verschiedene Phosphatasen nebeneinander ausgebildet haben. Das dürfte, außer bei Hefe, auch beim Tierkörper der Fall sein. Die Nieren-phosphatase wirkt jedenfalls im natürlichen Milieu vom Muskelferment verschieden; letzteres ist stark am glykolytischen Prozeß beteiligt, dessen erste Phasen mit den zymatischen Hefenwirkungen weitgehend übereinstimmen. Diese Tatsache ist analog dem Vorkommen am selben Orte von zwei spezifisch unterscheidbaren Fermenten, die das gleiche Substrat angreifen, so von

[1] Auch gegenüber Glycerophosphat als Substrat erfährt Nieren-phosphatase nach einer soeben erschienenen Mitteilung von *H. Erdtman* (H. 172, 182, 1927) eher Hemmung.

[2] *C. Neuberg* und *J. Leibowitz*, diese Zeitschr. 187, 481, 1927.

[3] *Dieselben*, ebendaselbst 191, 456, 1927.

[4] *Dieselben*, ebendaselbst 191, 450, 1927.

[5] Die Erwartung, auf diesem Wege aus dem Di-phosphat den Monophosphorsäure-ester in erhöhter Ausbeute zu erhalten, hat sich vorläufig nicht erfüllt.

zwei Maltasen in einigen Gerstenmalzsorten[1], ebenso im Hundedarm und -pankreas[2], von zwei spezifisch verschiedenen Amylasen im Mund- und Bauchspeichel[3] und von zwei verschiedenen, die Gentiobiosebindung lösenden Fermenten in gewissen Hefen[4].

Beschreibung der Versuche.

Wenn man als einfache Methodik die Kolorimetrie verwenden will, so empfiehlt sich die Benutzung des Magnesiumsalzes des Hexose-di-phosphorsäure-esters als Substrat nicht, da infolge der Bildung des schwerlöslichen Magnesiumphosphats[5] bei der Hydrolyse die Phosphorsäure-bestimmungen nur angenäherte Werte liefern können. Sämtliche hier beschriebenen Versuche wurden daher mit dem Natriumsalz ausgeführt, zu dessen Darstellung folgender Weg sich als geeignet erwies.

Man geht vom Ba-Salz aus, das durch Lösen in sehr verdünnter Salzsäure, genaues Neutralisieren der Lösung mit Natronlauge, Ausfällung durch Erhitzen, Absaugen und Auswaschen mit heißem Wasser gereinigt wird. Das Ba-Salz schließt sehr viel Wasser ein, das an der Luft und selbst im Vakuumexsikkator über H_2SO_4 hartnäckig festgehalten wird. In diesem Zustande läßt sich das Bariumsalz nur schwer pulverisieren. Es ist daher zweckmäßig, das Präparat auf der Nutsche durch mehrfaches Hindurchsaugen von 90 %igem, sodann von absolutem Alkohol weitgehend zu entwässern und erst dann auf Tonplatten zu trocknen. Die so gewonnenen Präparate enthalten immer noch bis zu 20 % Wasser, haben aber die Konsistenz eines trockenen, staubfein zerreibbaren Pulvers.

Wir kontrollierten die Reinheit des von uns verwendeten Hexose-di-phosphats durch die Drehungsbestimmung an einer bei 78° im Hochvakuum über P_2O_5 getrockneten Probe:

0,7960 g Ba-Salz (entsprechend 0,4433 g Säure) mit 5,22 ccm n HCl zu 10,0 ccm gelöst.

$[\alpha]_D = +4{,}3^\circ$. $(\alpha = +0{,}38^\circ,\ l = 2,\ c = 4{,}433.)$

Zur Weiterverarbeitung bestimmt man den Ba-Gehalt (das lufttrockene Präparat enthielt 35,1 % Ba) und trägt das fein zerriebene Material in die berechnete Menge n H_2SO_4 unter Umrühren ein. Man kann schon nach einigen Minuten filtrieren und erhält eine von $Ba^{\cdot\cdot}$- und SO_4''-Ionen freie Lösung, die mit Natronlauge genau gegen Phenolphthalein neutralisiert wird.

Dieses Verfahren war der direkten Umsetzung des Ba-Salzes mit der berechneten Menge gelösten Na_2SO_4 vorzuziehen, da im letzteren Falle die Reaktion erst nach andauerndem Schütteln auf der Maschine quantitativ verlief

In der erhaltenen Na-Salz-lösung bestimmt man einen eventuell vorhandenen sehr geringen Gehalt an freiem Phosphat durch direkte Kolorimetrie, den Gesamt-P-Gehalt in einer veraschten Probe gravimetrisch

[1] *H. Pringsheim* und *J. Leibowitz*, diese Zeitschr. **161**, 456, 1925; *J. Leibowitz*, H. **149**, 184, 1925.
[2] *H. Bierry*, C. r. **149**, 314, 1912.
[3] *H. Pringsheim* und *J. Leibowitz*, B. **59**, 991, 1926.
[4] *H. Pringsheim*, *J. Bondi* und *J. Leibowitz*, B. **59**, 1983, 1926.
[5] Vgl. *C. Neuberg* und *J. Leibowitz*, diese Zeitschr. **187**, 486, 1927.



und die Konzentration der Hexose-di-phosphorsäure aus der Differenz der beiden Werte.

Die Messung der Phosphorsäure-abspaltung bei den Versuchen erfolgte kolorimetrisch. Je 1 ccm Versuchslösung versetzten wir mit 5 ccm 10%iger Trichloressigsäure und verdünnten das eiweißfreie Filtrat mit so viel Wasser, daß die P-Konzentration der Größenordnung nach unserer Standardlösung (0,083 mg P pro Kubikzentimeter) entsprach. Mit jeder Versuchsreihe wurde ein Kontrollansatz verbunden, in dem das Fermentmaterial mit Chloroform und Toluol und der entsprechenden Menge Wasser aufgeschlemmt war. Die P-Werte aus diesen Kontrollversuchen sind in den folgenden Tabellen von den Werten der Hauptversuche in Abzug gebracht. Durch weitere Kontrollversuche überzeugten wir uns, daß die selbsttätige P-Abspaltung aus dem Ester unter den von uns gewählten Reaktionsbedingungen vernachlässigt werden darf.

Schließlich war noch der Anteil des zugesetzten Arsenats an der Gesamtfärbung bei der Kolorimetrie zu berücksichtigen. Dieses geschah durch Kolorimetrieren der Stamm-Arsenatlösung (2,0 g Mono-kalium-arsenat in 100 ccm = m/10) gegen den Phosphat standard. Arsenat wird durch das Molybdat-Eikonogen-reagens von *Lohmann* und *Jendrassik* in ähnlicher Weise blau gefärbt wie Phosphat; lediglich bei hohen Konzentrationen nimmt die Färbung einen eben wahrnehmbaren Stich ins Grüne an, der jedoch den Vergleich nicht stört. Bemerkenswert ist, daß die durch äquimolekulare Lösungen von Arsenat und Phosphat hervorgerufenen Färbungen von sehr verschiedener Intensität sind: m/100 Kaliumarsenatlösung entsprach in dieser Hinsicht etwa einer m/500 KH_2PO_4-Lösung. Die As-Werte sind in den Tabellen gleichfalls von den Versuchswerten abgezogen.

Aktivierung der Hefe-phosphatase durch Arsenat.

Ansätze. Je 50 ccm einer rund 3,3%igen Na-hexose-di-phosphatlösung, 5 g frische untergärige Hefe (*Schultheiss-Patzenhofer*), 3 ccm Chloroform, 3 ccm Toluol; dazu

in I: 25 ccm Wasser,
„ II: 1 „ m/10 Arsenat + 24 ccm Wasser,
„ III: 5 „ m/10 „ + 20 „ „
„ IV: 25 „ m/10 „

Die vier Ansätze enthielten zu Versuchsbeginn je 3,24 mg Ester-P pro Kubikzentimeter.

Zeit in Std.	Abgespaltener P							
	in mg pro ccm				in % des Gesamt-P			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
1	0,107	0,136	0,204	0,269	3,4	4,4	6,5	8,6
2½	0,241	0,302	0,678	1,182	7,7	9,7	21,7	37,9
16	0,652	0,699	1,041	1,755	20,9	22,4	33,4	56,2

Zur Kontrolle der Gärhemmung wurden 75 ccm 1%iger Zuckerlösung mit 5 g Hefe und je 3 ccm Chloroform und Toluol versetzt; in einem mit der umgeschüttelten Suspension gefüllten und bei 37° belassenen Eudiometer erfolgte keine CO_2-Entwicklung.

Zur Sicherstellung des Ergebnisses wurden auch einige gravimetrische Bestimmungen nach dem Vorgehen von *Neuberg* und *Kobel*[1] ausgeführt unter Verwendung einer anderen Probe der selben Hefenrasse.

Ansätze. Ia wie I, IIIa wie III.

Die P-Bestimmungen wurden in je 10,0 ccm Versuchslösung vorgenommen.

Zeit in Std.	Abgespaltener P			
	in g $Mg_2P_2O_7$		in % des Gesamt-P	
	Ia	IIIa	Ia	IIIa
2	0,0139	0,0401	12,0	34,5
6	0,0295	0,0793	25,4	68,2

Aktivierung der Taka-phosphatase durch Arsenat.

Ansätze. Je 20 ccm Na-hexose-di-phosphat-lösung, 10 ccm 2%ige Takadiastase-lösung, 2 ccm Toluol; dazu

in I: 10 ccm Wasser,
,, II: 5 ,, ,, + 5 ccm m/10 Arsenat,
,, III: 10 ,, m/10 Arsenat.

Ester-P pro Kubikzentimeter = 2,92 mg.

Zeit in Std.	Abgespaltener P					
	in mg pro ccm			in % des Gesamt-P		
	I	II	III	I	II	III
8	0,322	0,396	0,431	11,0	13,6	14,8
24	0,495	0,530	0,564	17,0	18,2	19,3

Nieren-phosphatase und Arsenatwirkung.

Ansätze. Je 20 ccm Na-hexose-di-phosphat-lösung + 20 ccm Nierensaft[2] + 2 ccm Toluol; dazu

in I: 20 ccm Wasser,
,, II: 10 ,, ,, + 10 ccm m/10 Arsenat,
,, III: 20 ,, m/10 Arsenat.

Ester-P pro Kubikzentimeter = 2,01 mg.

Zeit in Std.	Abgespaltener P					
	in mg pro ccm			in % des Gesamt-P		
	I	II	III	I	II	III
4	0,390	0,386	0,372	19,4	19,2	18,5
18	0,723	0,725	0,698	36,0	36,1	34,7

[1] a. a. O.

[2] Vgl. *C. Neuberg* und *J. Leibowitz*, diese Zeitschr. **191**, 458, 1927.

Abbau des Zymo-di-phosphats zum Mono-phosphat mit arseniat-aktivierter Hefe.

160 ccm Na-hexose-di-phosphatlösung, 40 ccm m/10 Arsenatlösung, 30 g Unterhefe (*Schultheiss-Patzenhofer*), je 5 ccm Chloroform und Toluol, bei 37°. Die Lösung enthält pro Kubikzentimeter 5,04 mg Ester-P.

Abgespalten nach 2 Stunden 0,744 mg P pro Kubikzentimeter = 15 %, nach 7 Stunden 2,712 mg P = 54 %. In einem Kontrollansatz ohne Arsenat betrug die Entesterung um diese Zeit erst 22 %.

Die Aufarbeitung in der von uns geübten Weise lieferte 0,7 g rohes Ba-hexose-mono-phosphat, nach der Reinigung mit Quecksilberacetat 0,5 g reines Präparat.

0,3833 g Ba-Salz (getrocknet bei 78° im Hochvakuum), entsprechend 0,2521 g Säure, mit 1,95 ccm n HCl zu 10,0 ccm gelöst.

$[\alpha]_D = + 2{,}2^0$ ($\alpha = + 0{,}11^0$, $l = 2$, $c = 2{,}521$).

3,0 ccm dieser Lösung (enthaltend 0,1150 g Substanz) lieferten 0,0684 g $BaSO_4$.

Ba ber.: 34,7 %; gef.: 35,0 %.

3,0 ccm der Lösung (enthaltend 52,4 mg Hexose), mit 0,58 ccm n NaOH neutralisiert, verbrauchten bei der Reduktionsprobe nach *Auerbach-Bodländer* 1,20 ccm n/10 J; also entspricht das Reduktionsvermögen 21 % der äquivalenten Aldohexosemenge.

Für den *Neuberg* ester werden als Drehung angegeben $[\alpha]_D = + 1{,}5$ bzw. $+ 2{,}5^0$, als Reduktionsvermögen 18 %.

Die Wiederholung des Versuchs mit der gleichen Hefe zu anderer Zeit führte zu demselben Ergebnis.

Die Struktur der Hexose-phosphorsäure-ester und des Methylglyoxals nach ihrem spektrographischen Verhalten.

Von

Carl Neuberg und Svend Aage Schou[1].

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem und dem Physikalisch-chemischen Institut der Universität Zürich.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Nach vorliegenden Befunden, besonders auch nach den jüngst[2] mitgeteilten Erfahrungen müssen sowohl die Hexose-phosphorsäure-ester als das Methylglyoxal mit wechselnden Strukturen in chemische sowie biochemische Prozesse eintreten können.

Zur Erlangung neuer Anhaltspunkte haben wir uns zur Vornahme der im folgenden beschriebenen Experimente über das spektographische Verhalten dieser Substanzen vereinigt.

Allgemeine Methodik.

Zur Feststellung der Extinktionskoeffizienten wurde die von *V. Henri*[3] angegebene spektro-photographische Methode verwendet. Nach dieser Methode werden eine Reihe von Spektren abwechselnd durch das reine Lösungsmittel und durch dieselbe Schichtdicke von der Lösung aufgenommen. Die Schichtdicken werden variiert, und die genau gemessenen Expositionszeiten so gewählt, daß die Spektren, die durch die Lösung photographiert werden, immer eine längere Zeit (z. B. 60 Sekunden) belichtet werden, als die durch das Lösungsmittel (z. B. 10 Sekunden). Auf den Platten werden die Punkte aufgesucht, an denen man in den zusammengehörigen Lösungsmitteln und Lösungsspektren dieselbe Schwärzung hat; dann werden die Wellenlängen festgestellt. Für diese Punkte haben wir zur Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten ε den Ausdruck:

$$\varepsilon = \frac{0{,}9}{c \cdot d} \cdot \log \frac{t}{t_0},$$

in dem c die molare Konzentration, d die Schichtdicke in Zentimetern. t die Belichtungszeit für die Lösung und t_0 die Belichtungszeit für das Lösungsmittel darstellt.

---

[1] Fellow of the International Education Board.

[2] *C. Neuberg* und *J. Leibowitz*, diese Zeitschr. **187**, 481, 1927; **191**, 450 und 456, 1927.

[3] *V. Henri*, Physikal. Zeitschr. **14**, 515, 1913.

Die Aufnahmen sind auf Hauff-Ultra-Rapid-Platten gemacht, die für das äußerste Ultraviolett (nach *V. Henri*) mittels Transformatoröl sensibilisiert wurden.

In den nachstehenden Abb. 1 bis 3 ist der Logarithmus ε als Ordinate, die Wellenlängen λ in Ångström-Einheiten oder in Wellenzahlen, $1/\lambda$ in cm^{-1} ausgedrückt, als Abszisse eingetragen.

Die Ester.

1. *Hexose-di-phosphorsäure* kam als Magnesiumsalz zur Anwendung, das nach *Neuberg* und *Sabetay*[1] aus selbstbereitetem hexose-di-phosphorsaurem Calcium gewonnen war; die Verbindung war absolut rein, enthielt kein anorganisches Phosphat und löste sich klar in Wasser.

2. *Hexose-mono-phosphorsäure-ester* aus Zymo-di-phosphat war nach *Neuberg*[2] hergestellt und lag als Calciumsalz vor; dieses war in kaltem und heißem Wasser leicht und klar löslich.

3. *Gärungs-Hexose-mono-phosphorsäure-ester* nach *Robison* war nach der Vorschrift von *Neuberg* und *Leibowitz*[3] als Bariumsalz erhalten; es löste sich völlig klar in kaltem und heißem Wasser auf.

Alle drei Ester-Salze waren rein, insbesondere auch N-frei. Die spezifischen Drehungen der betreffenden drei Säuren waren:

1. $\alpha]_D = +3{,}44^0$, 2. $[\alpha]_D = +1{,}53^0$ und 3. $[\alpha]_D = +26{,}88^0$.

Die drei Zucker-phosphorsäure-ester sind in wässerigen Lösungen zur Untersuchung gekommen. Als Lösungsmittel diente sorgfältig destilliertes Leitfähigkeitswasser, und die Substanzen sind, nach orientierenden Aufnahmen an 0,10 mol. Lösungen, in 0,01 bis 0,005 mol. Lösungen untersucht worden. (Die Molarität ist bei allen Substanzen so gerechnet, daß sie sich auf 1 Mol. Hexose bezieht.)

Wie die Extinktionskurven Abb. 1 zeigen, besitzen alle drei Zucker-phosphorsäure-ester außer einer ziemlich starken Allgemeinabsorption eine *Absorptionsbande mit dem Maximum bei etwa 2630* Å.

Was die Allgemeinabsorption bedeutet, ist zurzeit nicht zu sagen, es ist wahrscheinlich, daß sie bei allen drei Estern von derselben Natur ist, weil die Absorptionskurve mit derselben Neigung verläuft. Sehr bemerkenswert finden wir es aber, daß die Lage des Maximums der charakteristischen Absorptionsbande genau mit dem Absorptionsmaximum des Acetons zusammenfällt.

Es läge nahe, diese Absorptionsbande gleich derjenigen des Acetons als von der Carbonylgruppe verursacht anzusehen; wir möchten mit der Möglichkeit rechnen, daß die Ester im Gegensatz zu den freien Hexosen die Carbonylgruppe teilweise frei enthalten, sofern das

---

[1] *C. Neuberg* und *S. Sabetay*, diese Zeitschr. **161**, 240, 1925.
[2] *C. Neuberg*, ebendaselbst **88**, 432, 1918.
[3] *C. Neuberg* und *J. Leibowitz*, ebendaselbst **184**, 489, 1927.

Absorptionsbild nicht der Ausdruck einer speziellen Molekülstruktur ist, die durch die Phosphorsäuregruppen im Verein mit einer besonderen Sauerstoffbrücke bedingt ist.

Wir müssen hier die Untersuchung *P. Niederhoffs*[1] über die Absorption der Zucker erwähnen, aus welcher der Autor auf das Vorhandensein einer Carbonylgruppe in den wässerigen Lösungen der freien Zucker schloß. Allerdings haben *L. Kwiencinsky* und *L. Marchlewski*[2] die Meinung vertreten, daß bei diesen Versuchen die vor-

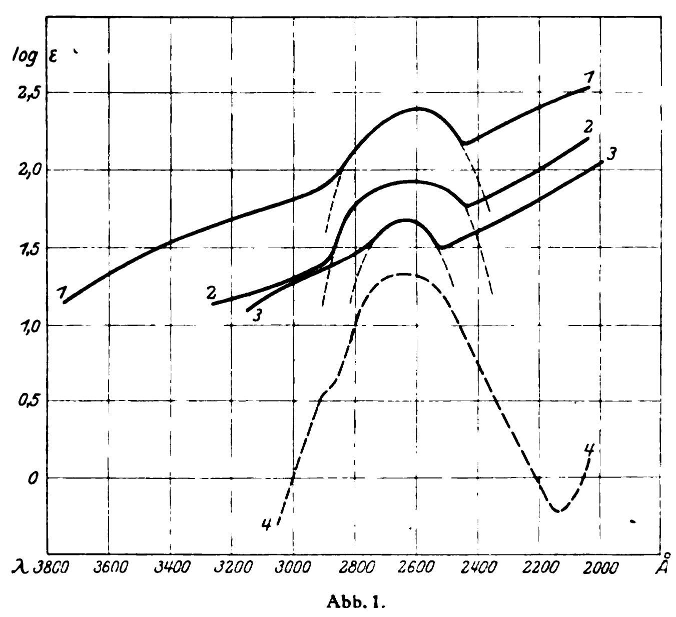


Abb. 1.

1 = *Robison*-Ester im Wasser. 2 = Hexose-di-phosphorsäure im Wasser. 3 = *Neuberg*-Ester im Wasser. 4 = Aceton im Wasser.

nehmlichste Bedingung für spektrographische Untersuchungen — die Anwendung absolut reiner Substanzen — nicht erfüllt gewesen sei, eine Voraussetzung, die im Falle so schwach absorbierender Substanzen, wie der freien Zucker, durch Innehaltung ganz spezieller Vorsichtsmaßregeln berücksichtigt werden muß.

Wollen wir unsere Versuche mit denen von *Niederhoff* vergleichen, so fällt sofort auf, daß die ε-Werte für die Zucker-phosphorsäure-ester von einer Größenordnung sind, die 10- bis 100 mal höher ist, als die von *N.* für die freien Zucker angegebene.

---

[1] *P. Niederhoff*, H. **165**, 130; **167**, 310, 1927.

[2] *L. Kwiecinsky* und *L. Marchlewski*, ebendaselbst **169**, 300, 1927.

Methylglyoxal.

Darstellung und Reinigung der verwendeten Substanz.

Das verwendete Methylglyoxal war nach der bewährten und uns sehr geläufigen Vorschrift von *H. O. L. Fischer* und *C. Taube*[1] dargestellt. Durch dreimalige Destillation war die Substanz gereinigt; sie wurde noch vor Eintritt einer Polymerisation, d. h. sofort nach Rektifikation, in reinem Wasser gelöst. Sie war frei von Phosphor.

Das Methylglyoxal kam in wässeriger Lösung zur Untersuchung. In den Abb. 2 und 3 ist die gefundene Extinktionskurve wiedergegeben,

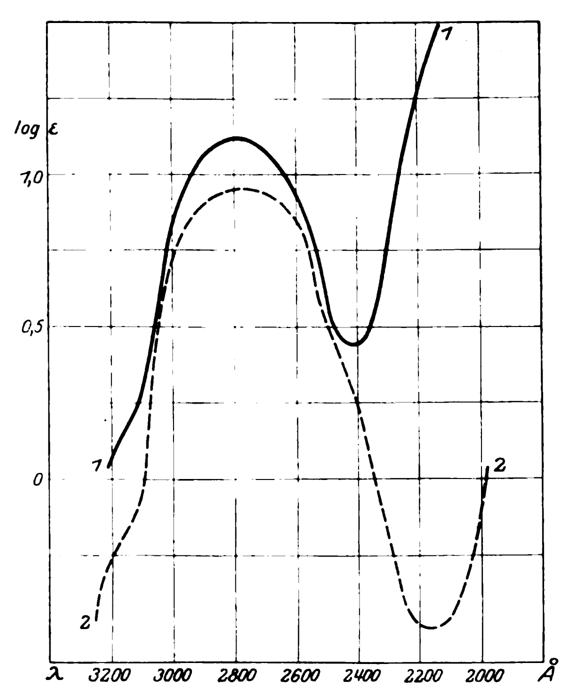


Abb. 2. 1: Methylglyoxal im Wasser. 2: Propionaldehyd im Wasser (*Schou*, C. r. 182, 965, 1926).

bei der Abb. 2 sind die Wellenlängen in Ångström-Einheiten, in der Abb. 3 in Wellenzahlen in cm^{-1} als Abszisse eingetragen.

Wie aus Abb. 2 hervorgeht, nimmt die Absorption von 3200 Å an rasch zu, um bei 2780 Å ihr Maximum zu erreichen mit einem Extinktionskoeffizienten $\varepsilon = 13{,}2$. Mit kürzeren Wellen nimmt die Absorption wieder ab, durchläuft ein Minimum bei 2415 Å ($\varepsilon = 2{,}7$) und steigt dann in dem äußersten Ultraviolett wieder an, ohne jedoch in dem Gebiet, das uns mit unserer Methodik zugänglich gewesen ist, ein Maximum zu finden.

[1] *H. O. L. Fischer* und *C. Taube*, B. **59**, 857, 1926.

Dieser Absorptionsverlauf entspricht ganz dem Verlauf der Absorption bei aliphatischen Körpern, die nur *eine* Carbonylgruppe enthalten, was sehr deutlich aus einem Vergleich mit der Absorptionskurve des ***Propionaldehyds*** (2, Abb. 2) hervorgeht.

Das Vorhandensein einer Carbonylgruppe in einem sonst unkomplizierten aliphatischen Körper erkennt man in dem Absorptionsspektrum durch eine breite Absorptionsbande mit einem Maximum, das für Aldehyde in wässeriger Lösung bei etwa 2800 Å liegt und das für Ketone etwas gegen das Ultraviolett verschoben ist (Maximum etwa 2700 Å), mit einem Werte des Extinktionskoeffizienten ε zwischen

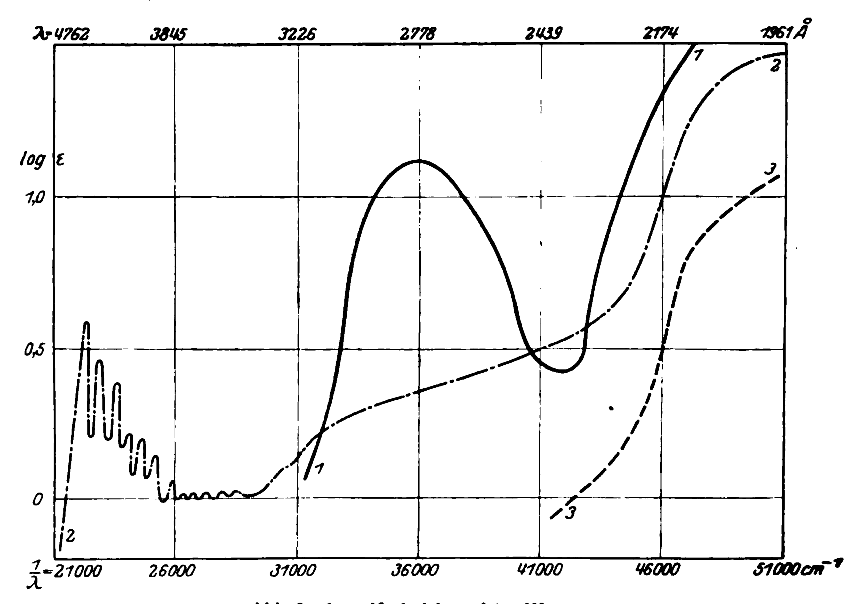


Abb. 3. 1 = Methylglyoxal im Wasser.
2 = Glyoxal in Hexan (*Lüthy*, Zeitschr. f. phys. Chem. **107**, 285, 1923). 3 = Glyoxal im Wasser.

10 und 20. Die Einführung einer weiteren Carbonylgruppe in α-Stellung zu ersterer verschiebt die Absorptionsbande in das sichtbare Gebiet, sie ist in eine Reihe von ganz schmalen Banden zerlegt, wie sich aus der Absorptionskurve des *Glyoxals* in Hexanlösung (2, Abb. 3) ergibt, die wir nach *A. Lüthy*[1] zum Vergleich aufgetragen haben. Nun weisen Glyoxal und Methylglyoxal ja weitgehende Übereinstimmungen auf in ihrem Verhalten, wenn sie wasserfrei und monomer vorliegen. Sie stellen beide niedrig siedende gelbe Flüssigkeiten dar, die grüngelbe, stechend riechende Dämpfe aussenden. Wir vermuten, daß das wasserfreie Methylglyoxal (über dessen Absorption wir später zu berichten hoffen) eine Absorptionskurve ähnlich derjenigen des Glyoxals geben wird.

[1] *A. Lüthy*, Zeitschr. f. phys. Chem. **107**, **285**, **1923**.

Nach *J. Meisenheimers*[1] Befunden enthalten frisch dargestellte Lösungen von Methylglyoxal eine trimere Form. Nach 24 Stunden ist aber die Substanz nur in monomerer Gestalt als ein farbloses Hydrat vorhanden, über dessen Struktur uns jetzt das Absorptionsspektrum eine Auskunft geben kann.

Wir können die Absorptionskurve des Methylglyoxals in wässeriger Lösung so deuten, daß bei der Hydrat-bildung die eine Carbonylgruppe ganz hydratisiert worden ist, wodurch sie ihre absorbierende Kraft und bis zu einem gewissen Grade ihren Einfluß auf die Absorption der anderen Carbonylgruppe verloren hat, so daß wir eine Substanz bekommen haben, die nur eine freie Carbonylgruppe erkennen läßt:

$$\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CO + H_2O \\ | \\ CHO \end{array} \longrightarrow \begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ C{<}^{OH}_{OH} \\ | \\ CHO. \end{array}$$

Diese Annahme stimmt, sowohl was die Lage des Maximums als die Größe ε betrifft, völlig mit früheren Untersuchungen überein.

Ob es die Ketogruppe oder die Aldehydgruppe ist, die Hydratisierung erfahren hat, läßt sich nur mit Zurückhaltung sagen. Es scheint uns denkbar, daß es die Ketogruppe ist, die verschwindet, weil die Lage des Maximums eine so weitgehende Übereinstimmung mit derjenigen des Propionaldehyds aufweist.

Man könnte die Frage aufwerfen, ob es nicht zu erwarten wäre, daß die gebildeten Hydroxylgruppen die Lage der Carbonylbande beeinflussen. Eine Untersuchung über die Absorption des Dioxyacetons (sie wird später publiziert) hat uns aber gezeigt, daß das nicht der Fall ist: die Absorptionsbande des *Dioxyacetons* paßt gut zu derjenigen des Acetons.

Endlich möchten wir erwähnen, daß wir auch die Absorption des monomeren *Glyoxals* im Wasser bestimmt haben.

Das Glyoxal wurde nach *C. Harries* und *P. Temme*[2] in einem Apparat ganz aus Pyrexglas dargestellt und in demselben Apparat fraktioniert. Die Lösung in Leitfähigkeitswasser wurde in frisch bereitetem Zustande wie auch nach 48 Stunden photographiert.

Die Absorption hat sich in den beiden Fällen als identisch erwiesen. Die Absorptionskurve (3, Abb. 3) zeigt, daß Glyoxal in wässeriger Lösung ganz hydratisiert ist, die Lösung gibt nur eine schwache Allgemeinabsorption im äußersten Ultraviolett, wie z. B. auch der ganz hydratisierte Formaldehyd.

---

[1] *J. Meisenheimer*, Ber. 45, 2635, 1912; vgl. auch *H. O. L. Fischer* und *C. Taube*, l. c.

[2] *C. Harries* und *P. Temme*, B. 40, 165, 1907.

Vermeintliche Abfangung von Methylglyoxal bei der alkoholischen Gärung.

Von

Carl Neuberg und **Maria Kobel.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Unsere Vorstellungen über den Verlauf der desmolytischen Zuckerspaltungen gehen von einer Dismutationsreaktion aus, die am Hydrat des Methylglyoxals ansetzt[1]. Die Berechtigung für diese Anschauung erfuhr eine Stärkung durch die Auffindung eines biologischen Prozesses, der sich nachweislich in zahlreichen Zellarten vollzieht. Er besteht in der Umlagerung des labilen Methylglyoxal-hydrats zur stabilen Milchsäure unter dem Einflusse der Ketonaldehyd-mutase. Da die Bildung von Milchsäure einer der verbreitetsten Grundvorgänge des Stoffwechsels bei höheren und niederen Lebewesen ist, kann es nicht wundernehmen, daß die Existenz des erwähnten Ferments, das Milchsäure aus Methylglyoxal erzeugt, sich in allen Fällen zu erkennen gab, in denen der alkoholischen Zuckerspaltung an die Seite zu stellende Umsetzungen statthaben. Nachdem die Umwandlung des Methylglyoxalhydrats durch verschiedenartige tierische Zellen[2] geglückt war, gelang die Verwirklichung der Reaktion bei mannigfachen Mikroorganismen, z. B. für die Erreger der kompletten Milchsäure-gärung[3] (Lactobazillus, Bazillus Delbrücki), der gemischten Milchsäure-gärung[3,4] (B. coli, B. lactis aerogenes), der über die Lactatstufe sich vollziehenden Propionsäure-gärung[3] und der Essig-gärung[5]. In den Zellen der Samen-

---

[1] *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **31**, 170, 1911.

[2] *Derselbe*, ebendaselbst **49**, 502, 1913; **51**, 484, 1913; *O. Warburg, K. Posener* und *E. Negelein*, ebendaselbst **152**, **317**, **1924**.

[3] *C. Neuberg* und *G. Gorr*, diese Zeitschr. **166**, 482, 1925; *C. Neuberg* und *E. Simon*, ebendaselbst **186**, 331, 1927.

[4] *C. Neuberg* und *G. Gorr*, ebendaselbst **162**, 490, 1925.

[5] *G. Gorr* und *G. Perlmann*, ebendaselbst **174**, 433, 1926.

pflanzen[1], wie Bohnen, Erbsen, Lupinen, Roggen und des Tabaks[2], sowie — nach einer in Druck befindlichen Mitteilung — auch in grünen Blättern von Phanerogamen, wie Buchen, Dahlien, Gingko biloba, Platanen, wildem Wein (Ampelopsis Veitschi), Wirsingkohl (Brassica sabanda), ist ebenfalls das Enzym nachgewiesen, das Methylglyoxalhydrat zu Milchsäure dismutiert.

Trotz dieses großen Versuchsmaterials, das die biologische Bedeutung des Methylglyoxals und des darauf abgestimmten Ferments über alle Zweifel erhebt, ist es ein höchst erstrebenswertes Ziel, das Methylglyoxal als Zwischenglied der Zuckerspaltung festzulegen, so wie dies unsere Methoden zur Abfangung des Acetaldehyds gestatten.

Bei Ausarbeitung dieser Abfangverfahren haben wir unter anderem mit besonderer Begründung die Verwendung von Säurehydraziden empfohlen[3]. Während wir[4] mit einem derselben, dem Carbaminsäurehydrazid (Semicarbazid), Acetaldehyd zu fixieren vermochten, gaben *S. Kostytschew* und *S. Soldatenkov*[5], die diesen Vorschlag aufgriffen, an, mit demselben Reagens das Methylglyoxal abgefangen zu haben, während sie von einer Bindung des Acetaldehyds nichts erwähnen. Die Veröffentlichung der genannten russischen Autoren haben wir mit großer Freude und hohen Erwartungen begrüßt, weil wir hofften, allgemein auf diese Weise die intermediäre Entstehung von Methylglyoxal dartun zu können. Wir sahen uns aber leider in dieser Zuversicht schon bei unseren ersten Bemühungen enttäuscht, die Abfangung des Methylglyoxals bei der Vergärung von Zucker durch zwei typische, ganz normale deutsche Hefen, eine untergärige und eine obergärige Sorte, zu wiederholen. Wir erhielten bei genauester Innehaltung der Vorschriften von *Kostytschew* und *Soldatenkov* zwar eine Substanz, die ihrer Beschreibung entsprach und bei flüchtiger Betrachtung für das Di-semicarbazon des Methylglyoxals gehalten werden könnte. In Wirklichkeit offenbarte sie sich uns jedoch als ein *Produkt der Zersetzung des angewendeten Semicarbazids.* Sie ist *Hydrazo-di-carbon-amid.* Diese Verbindung hat den Schmelzpunkt 257° und ist schwer löslich in Wasser. Aus unserer Kenntnis dieser Körperklasse heraus mußten wir uns wundern, daß das Hydrazo-di-carbon-amid nicht unter den von den russischen Autoren innegehaltenen Bedingungen

---

[1] *C. Neuberg* und *G. Gorr*, diese Zeitschr. **171**, 475, 1926; **178**, 358, 1926; *G. Binder-Kotrba*, ebendaselbst **174**, 443, 1926; *L. Klar*, ebendaselbst **186**, 327, 1927.

[2] *C. Neuberg* und *M. Kobel*, ebendaselbst **179**, 488, 1926.

[3] *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, ebendaselbst **106**, 286, 1920.

[4] *C. Neuberg* und *M. Kobel*, ebendaselbst **188**, 211, 1927.

[5] *S. Kostytschew* und *S. Soldatenkov*, H. **168**, 128, 1927.

entstehen sollte. Man weiß seit langem, daß freies Semicarbazid unbeständig ist. *Th. Curtius* und *K. Heidenreich*[1] hatten gezeigt, daß es beim Erhitzen und selbst beim Aufbewahren unter Abtrennung von Hydrazin in Hydrazo-di-carbon-amid übergeht. Aber auch die *wässerige Lösung des Semicarbazids unterliegt der gleichen Umwandlung*:

$$2\,NH_2 . CO . NH . NH_2 = N_2H_4 + NH_2 . CO . NH - NH . CO . NH_2.$$

Diese ist, wie man sieht, der Bildung von Biuret aus Harnstoff völlig vergleichbar.

Läßt man *eine mit Soda neutralisierte Lösung von Semi-carbazid-chlorhydrat*, so wie sie die russischen Autoren vorschreiben, 3 Tage bei 25° oder 28° stehen und setzt sie denselben Prozeduren aus, denen ihre wirklichen Gäransätze unterworfen werden, d. h. erhitzt man sie zum Sieden und erwärmt sie so lange auf dem Wasserbade, wie die Filtration eines Hefen-gutes am Heißwasser-trichter dauern würde, und dampft dann im Vakuum ein, so erhält man das *Hydrazo-di-carbon-amid* vom Schmelzpunkt 257°. Die Ausbeute ist in rein wässerigen Lösungen am größten; fügt man Hefe und Zucker hinzu, so entsteht weniger von diesem Körper. Die Gründe dafür sind klar. Ein Teil des Semicarbazids vereinigt sich mit dem Kohlenhydrat und, wie wir feststellten, rund zur Hälfte mit dem wirklich unzweifelhaften Gärungsprodukt Acetaldehyd. (Hierdurch wird unser früherer mit Semicarbazid gemachter Befund bestätigt, und es ergab sich zugleich, daß unter den Versuchsbedingungen der russischen Autoren die Ausbeuten an Acetaldehyd sogar steigen.) Das Acetaldehyd-semicarbazon sowie die Semicarbazone der in Betracht kommenden 6-Kohlenstoff-zucker sind leicht löslich und schmelzen niedriger. Sie kristallisieren mehr oder minder aus dem weitgehend eingeengten Gärgut aus. Konzentrierte man dieses nur so weit, wie *Kostytschew* und *Soldatenkov* vorschlagen, so fiel auch in unseren Versuchen beim Stehen allein eine schwer lösliche Substanz aus. Sie ist aber das erwähnte Zersetzungsprodukt des Semicarbazids, das Hydrazo-di-carbon-amid[2]. Kristallisiert man die aus dem Gärgut erhaltene rohe Verbindung, wie schon von *H. Rupe* und *S. Kessler*[3] empfohlen und auch seitens der russischen Forscher geschehen ist, aus Ameisensäure und dann aus Wasser um, so erhält man das Hydrazo-di-carbon-amid rein. Daß dieser Stoff, und nicht ein Methylglyoxal-derivat vorliegt, ergibt sich, wenn man die Eigenschaften in üblicher Weise präzisiert.

[1] *Th. Curtius* und *K. Heidenreich*, B. 27, 55, 1894; Journ. f. prakt. Chem. [2] 52, 466, 1895.

[2] Als erste sind *Ch. Moureu* und *R. Delange* (Bull. Soc. Chim. [3] 25, 302, 1901) beim Versuch der Gewinnung eines Semicarbazons auf die Entstehung von Hydrazo-di-carbon-amid aufmerksam geworden.

[3] *H. Rupe* und *S. Kessler*, B. 42, 4719, 1909.



Verhalten von:

Hydrazo-di-carbon-amid	*Methylglyoxal-di-semicarbazon*
F. 257°. (Unter völliger Bewahrung der Farblosigkeit.)	F. 257 bis 258°. (Unter starker Braunfärbung.)
In 100 ccm siedenden Wassers lösen sich rund 0,76 g.	In 100 ccm siedenden Wassers lösen sich rund 0,21 g.
In 100 ccm siedender 50 %iger Ameisensäure lösen sich etwa 1,4 g.	In 100 ccm siedender 50 %iger Ameisensäure lösen sich etwa 6,3 g.
Löst sich farblos in 30 %iger wässeriger Natron- oder Kalilauge.	Löst sich in 30 %iger wässeriger Natron- oder Kalilauge mit tief zitronengelber Farbe.
Geht durch Oxydation mit Bichromat-Schwefelsäure in das charakteristische orangefarbene Azo-di-carbon-amid über.	Scheidet bei der Oxydation keinen gefärbten Körper aus.
Liefert bei Behandlung mit essigsaurem p-Nitro-phenyl-hydrazin kein rotes Osazon.	Gibt[1] durch doppelte Umsetzung mit essigsaurem p-Nitro-phenyl-hydrazin in praktisch quantitativer Ausbeute das bekannte tiefrote Methylglyoxal-p-nitro-phenyl-osazon von *Neuberg* und *Kansky*[2].

Die Ähnlichkeit der beiden Verbindungen ist somit rein äußerlich[3]; sie besteht in einer gewissen Schwerlöslichkeit und im Schmelzpunkt.

Der Mischschmelzpunkt jedoch liegt am selben Thermometer und bei gleichzeitiger Erhitzung von Proben der beiden reinen Substanzen um 5° niedriger.

Die analytische Zusammensetzung des Methylglyoxal-derivates ($C_5H_{10}N_6O_2$) ist: C = 32,26, H = 5,37, N = 45,16 %, während Hydrazo-di-carbon-amid ($C_2H_6N_4O_2$) die Zusammensetzung C = 20,34, H = 5,09, N = 47,46 % aufweist.

Wie man sieht, unterscheiden sich die beiden Körper im Kohlenstoffgehalt um 12 %. Im Stickstoffgehalt besteht nur eine Differenz

[1] Durch Analyse und Schmelzpunkt (285°, unkorr.) identifiziert.

[2] *C. Neuberg* und *E. Kansky*, B. 41, 962, 1908.

[3] Wer beide Substanzen aus Beschäftigung mit diesem Gegenstande kennt, wird nicht in die Verlegenheit der Verwechslung kommen. Aus Wasser kristallisiert das Hydrazo-di-carbon-amid in schnell sich absetzenden, ziemlich groben, glitzernden Kristallen, das Methylglyoxal-di-semicarbazon fällt langsamer mikrokristallin nieder.

von 2 %. (Die russischen Autoren haben sich lediglich auf die Stickstoffanalyse beschränkt und den für das Methylglyoxal-derivat stimmenden Wert erhalten.)

Mit Hilfe der Laugen-reaktion, die wahrscheinlich auf Bildung eines gelb gefärbten Enolat-salzes beruht, kann man 1 Teil des Methylglyoxal-abkömmlings in 10 Teilen Hydrazo-di-carbon-amid nachweisen.

Die charakteristische Überführung des wahren Methylglyoxal-di-semicarbazons in das rote p-Nitrophenyl-osazon gelingt noch mit 0,2 mg.

Die Oxydation von Hydrazo-di-carbon-amid zum orangefarbenen Azokörper kann bequem mit 0,01 g ausgeführt werden.

Die Ausbeuten an der schwer löslichen Substanz sind bei uns nur $^1/_3$ bis $^1/_4$ so groß gewesen wie bei den russischen Autoren. Auf diesen Punkt möchten wir kein entscheidendes Gewicht legen; denn freies, auch zuvor nach *Breuer* oder *Bouveault* und *Locquin* in reiner Form dargestelltes Semicarbazid geht in Hydrazo-di-carbon-amid um so reichlicher über, je länger man erhitzt bzw. je öfter man das Filtrat des ersten Kristallanfalls wieder eindampft. Die Zersetzung erfolgt gleichfalls bei Stehen einer Semicarbazid-lösung in der Kälte, dann natürlich wesentlich langsamer.

Auszug aus den Protokollen.

Die Zusammensetzung der Gäransätze, die sowohl bei 25 als 28° und mit einwandfreier untergäriger (*Schultheiß-Patzenhofer*) wie obergäriger Hefe (*Sinner*) angestellt wurden, entsprach vollkommen den Angaben von *Kostytschew* und *Soldatenkov* (l. c.).

Je 1 Liter 10 %iger Rohrzuckerlösung wurde mit 30 g abgepreßter Hefe gut durchgeschüttelt. Nach 2½ Stunden wurden zu jedem in Gärung befindlichen Gemisch je 75 ccm einer mit Natriumcarbonat neutralisierten Lösung von 15 g Semicarbazid-chlorhydrat in destilliertem Wasser gefügt; die Dauer aller Versuche betrug 3 Tage.

Zum Vergleich gaben wir zu 1025 ccm Wasser 75 ccm einer mit Soda neutral gemachten Lösung von 15 g Semicarbazid-chlorhydrat in destilliertem Wasser und behandelten solche Versuche im übrigen wie die Hefen-ansätze.

Die Aufarbeitung jedes Gärgutes geschah genau so, wie *Kostytschew* und *Soldatenkov* sie beschreiben. Die Ausbeute an kristallisiertem Hydrazo-di-carbon-amid belief sich — sowohl in den Versuchen bei 25° als bei 28° und sowohl bei Benutzung von untergäriger als obergäriger Hefe — auf 0,4 bis 0,6 g aus je einem der oben beschriebenen Gäransätze von je 1100 ccm Gesamtvolumen. Die Eigenschaften der umkristallisierten Substanz stimmten mit den zuvor für das Hydrazo-di-carbon-amid angegebenen überein. Der Schmelzpunkt lag bei 257°, der Mischschmelzpunkt mit Methylglyoxal-di-semicarbazon bei 252 bis 253°. Der Körper löste sich vollkommen farblos in 30 %iger Lauge und gab mit essigsaurem p-Nitrophenyl-hydrazin kein unlösliches Osazon. Durch Kaliumbichromat-Schwefelsäure wurde er zu dem orangefarbenen Azo-di-carbon-amid oxydiert.

Nach der Vorschrift von *J. Thiele*[1] wurde 0,1 g des aus dem Gärgut isolierten Hydrazo-di-carbon-amids mit 10 ccm destilliertem Wasser zum Sieden erhitzt (wobei es sich nur teilweise löst) und heiß mit dem Gemisch von 0,16 g Kaliumbichromat, 0,6 ccm Wasser und 0,15 ccm konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Unter Aufbrausen trat Lösung des Hydroza-di-carbon-amids ein. Beim Abkühlen fiel sofort ein orangefarbenes Pulver aus, das sich bei Erhitzen im Schmelzpunktsrohr auf 180 bis 200° weiß färbte, genau wie es *Thiele*[2] für das Azo-di-carbon-amid angegeben hat[3].

Wir beschränken uns auf die Wiedergabe einer *Analyse* der aus den verschiedenen H fen-ansätzen abgeschiedenen Hydrazo-di-carbon-amid-proben.

0,1290 g Substanz: 0,0969 g CO_2 und 0,0604 g H_2O.
$C_2H_6N_4O_2$. Ber.: C = 20,34, H = 5,09%;
gef.: C = 20,49, H = 5,20%.

Aus den oben erwähnten Vergleichs-ansätzen (ohne Hefe und ohne Zucker) wurden bei genau gleichartiger Behandlung 0,6 bis 0,9 g Hydrazo-di-carbon-amid gewonnen.

Bei einem Teile der Versuche wurden vor dem Aufkochen der Gärgemische 100 ccm entnommen und zentrifugiert. 90 ccm klaren Zentrifugats wurden mit 2 g Phthalsäure-anhydrid 45 Minuten am Intensiv-Rückflußkühler gekocht. Dann wurde so lange mit Wasserdampf destilliert, als das Destillat die sehr empfindliche *Riminische* Probe auf Acetaldehyd noch gab. Nunmehr wurde die wässerige Lösung auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und der Acetaldehyd in üblicher Weise quantitativ bestimmt. Der Ertrag an $CH_3 . CHO$ belief sich danach aus 90 ccm des Ansatzes auf 0,210 bis 0,225 g, also aus den gesamten Ansätzen von je 1100 ccm auf 2,64 bis 2,75 g. Das entspricht einem Verbrauch von rund 7 g Semicarbazid-chlorhydrat. Das Acetaldehyd-semicarbazon, das in kaltem Wasser löslich ist, kristallisierte bei weiter getriebener Einengung des Gärgutes auch in erheblichen Mengen aus. Neben der Acetaldehyd-verbindung befand sich in dem erhaltenen Kristallgemisch noch Hexose-semicarbazon; denn eine verdünnte, wässerige Lösung dieses Substanzgemenges drehte polarisiertes Licht deutlich nach links.

Ein bei 36° mit Unterhefe angestellter Versuch lieferte bei gleichen Mengenverhältnissen der Ausgangsmaterialien 0,70 g Hydrazo-di-carbon-amid und 3,20 g Acetaldehyd.

Schlußfolgerung.

1. Es ist uns nicht gelungen, mittels Semicarbazid Methylglyoxal bei der alkoholischen Gärung abzufangen.

2. Die isolierte schwerlösliche Substanz erwies sich als Hydrazo-di-carbon-amid, ein Produkt freiwilliger Zersetzung des Semicarbazids.

---

[1] *J. Thiele*, A. 271, 129, 1892.
[2] *Derselbe*, A. 270. 43. 1892.
[3] Der Versuch kann noch mit zehnmal weniger *Substanz* durchgeführt werden.

Berichtigung

zur Mitteilung von *Schau-Kuang Liu*, diese Zeitschr. **185**, 242, 1927.

Auf Seite 251: Anstatt $[H^{\cdot}]^2$ und $[O'']$ in Gleichungen (4), (6) und (7) ist einzusetzen $[H]^2$ und $[O]$. Durch Oxydation eines Moleküls $C_6H_4(OH)_2$ wird auch ein Molekül $(H_{2}O)$ produziert.

Auf Seite 263: In der dritten Zeile von unten sind die Worte „wie der Sauerstoff" zu streichen.

Berichtigung

zu der Mitteilung von *A. Löw* und *R. Pfeiler*, diese Zeitschr. **187**, 114, 1927.

Auf Seite 115 die Überschrift zu Tabelle I muß heißen: Petrolätherfraktion in Prozenten.

Auf Seite 116 die Überschrift zu Tabelle II muß heißen: Alkoholfraktion in Prozenten.

Autorenverzeichnis.

